

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina Interna**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio clínico-patológico de los efectos de la terapia  
fotodinámica en pacientes con queratosis actínicas  
de cuero cabelludo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Gabriel Enrique Ughelli Yampey**

Directores:

**Domingo de Agustín Vázquez, Jesús Millán Núñez-Cortés,  
Fernando Jiménez Arrosagaray**

**Madrid, 2011**

ISBN: 978-84-695-0772-8

© Gabriel Enrique Ughelli Yampey, 2011

---

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

---

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO CLINICO-PATOLOGICO DE LOS EFECTOS DE LA  
TERAPIA FOTODINAMICA EN PACIENTES CON QUERATOSIS  
ACTINICAS DE CUERO CABELLUDO

GABRIEL ENRIQUE UGHELLI YAMPEY

MADRID 2011



---

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

---

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO CLINICO-PATOLOGICO DE LOS EFECTOS DE LA  
TERAPIA FOTODINAMICA EN PACIENTES CON QUERATOSIS  
ACTINICAS DE CUERO CABELLUDO

GABRIEL ENRIQUE UGHELLI YAMPEY

DIRECTORES:

DR. D. DOMINGO DE AGUSTÍN VÁZQUEZ

DR. D. JESÚS MILLÁN NÚÑEZ-CORTÉS

DR. D. FERNANDO JIMÉNEZ ARROSAGARAY





*Departamento de Medicina*

*Facultad de Medicina  
Pabellón I, 1ª planta  
Universidad Complutense  
28040 Madrid*

**Domingo de Agustín Vazquez, Jesús Millán Núñez-Cortés y Fernando Jimenez Arrosagaray,**

**CERTIFICAN:**

**Que bajo su dirección, Don Gabriel Enrique Ughelli Yampey ha realizado el trabajo de investigación titulado: "Estudio clínico-patológico de los efectos de la terapia fotodinámica en pacientes con queratosis actínicas de cuero cabelludo", como Tesis Doctoral.**

**Quienes suscriben consideran que el trabajo reúne todas y cada una de las condiciones para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral, y se muestran conformes con la presentación a tal fin.**

**Madrid, siete de febrero de dos mil once**

Dr. De Agustín Vázquez

Universidad Complutense  
 Departamento de Medicina  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón



10/10



Glorieta del Ejército, s/n  
Teléf.: 91 422 21 86  
28047 Madrid

## INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Miguel Puerro Vicente, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica de la Inspección General de Sanidad de la Defensa

### CERTIFICA:

Que en su reunión de 25-11-2010, Acta 09/10, este Comité ha evaluado la propuesta para que se realice el proyecto de investigación:

**TÍTULO:** *“Estudio clínico patológico de los efectos de la terapia fotodinámica en pacientes con queratosis actínicas de cuero cabelludo”.*

Y considera que:

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos y postulados éticos y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Por tanto, este CEIC **ACEPTA** que dicho estudio sea realizado por el Dr. Gabriel Enrique Ughelli Yampey del Servicio de Dermatología del Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 29 de noviembre de 2010



Fdo.: Dr. Miguel Puerro Vicente



## RESUMEN

---

La terapia fotodinámica (TFD) es una innovadora modalidad para el tratamiento de distintos tipos de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), entre ellos, las queratosis acnéicas (QA). Presenta también evidencia de su efectividad para la aparición de lesiones malignas y premalignas, especialmente en pacientes trasplantados con tratamiento inmunosupresor.

**Objetivos:** El presente trabajo persigue describir los cambios histológicos y moleculares que subyacen a este efecto preventivo. Para ello se estudiaron biopsias tomadas antes y después de 2 sesiones de TFD con metilaminolevulinato (MAL) en 35 pacientes. Se estudiaron los cambios histológicos e inmunohistoquímicos de expresión de proteínas de proliferación.

**Resultados:** Aumento del grosor de la dermis, disminuyendo el de la epidermis con reducción del infiltrado inflamatorio. Se incrementó la expresión del p53, sin modificación del Ki-67. Los hallazgos anormales no desaparecieron totalmente en todos los casos tras el tratamiento.

Estos hallazgos demuestran que la TFD tiene capacidad de reducir los signos específicos de fotoenvejecimiento cutáneo a nivel histológico. Igualmente, la reducción del p53, marcador de oncogénesis precoz en la piel, y la no alteración del ki-67, indicador de la actividad proliferativa, indican que induce reversión del proceso de carcinogénesis.

## ABREVIATURAS

---

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

ALA: ácido a-aminolevulínico

ALD: ALA deshidratasa

AP: Antecedentes patológicos

BUdR: Bromodeoxyuridina

CB: carcinoma basocelular

CCNM: cáncer cutáneo no melanoma

CE: carcinoma epidermoide/epinocelular

CEIC: Comité de ética e investigación

CRD: Cuaderno de recogida de datos

DE: Desviación estándar

DNA: ácido desoxiribonucleico, “desoxiribonucleic acid”

HCDGU: Hospital central de la defensa Gómez Ulla

HE: Hematoxilina y eosina (H&E)

IC: Intervalo de confianza

IHQ: inmunohistoquímica

ISFAS: Instituto social de las Fuerzas Armadas

MAL: 5-metil aminolevulinato

ME: Melanoma

PBS: Tampón fosfato salino, “phosphate buffer saline”

PCNA: Antígeno de células de proliferación nuclear, “proliferating cell nuclear antigen”

PCR: Reacción en cadena de las polimerasas, “polymerase chain reaction”

PpIX: Protoporfirina IX

PS: Psoriasis

QA: queratosis actínica

QS: Queratosis seborreica

SERMAS: Servicio madrileño de salud

TFD: terapia fotodinámica

UV: ultravioleta

UVA: ultravioleta A

UVB: ultravioleta B

VPH: virus del papiloma humano

VPL: luz pulsada variable, *variable pulsed light*

XP: xeroderma pigmentoso

5-FU: 5-fluorouracilo

“... En los tiempos de crisis, la imaginación es más importante que el conocimiento...”.

Albert Einstein.

Me gustaría dedicar esta Tesis a Belinda.

Para mis padres, mi tierra firme. Por darme todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor.

Para Jacin, Giovi, Richi y Kike, mis hermanos y mis mejores amigos.

Para Adri y mis sobrinos Fabi, Aloncho y Thiago que llenan nuestra vida de constante alegría.

A todos ellos,

Muchas gracias de todo corazón.



## AGRADECIMIENTOS

---

Deseo expresar mi gratitud más sincera a un grupo de personas sin las cuales hubiera sido del todo imposible el planteamiento y realización del presente trabajo.

Dedicar en primer lugar todo mi agradecimiento al Dr. D. Domingo de Agustín Vázquez, por aceptar la dirección de esta tesis y haberme orientado en la tarea investigadora, mostrando un constante e inestimable apoyo y entusiasmo en el proyecto.

Al Prof. Dr. D. Jesús Millán Núñez-Cortés, por su apoyo, privilegiada capacidad docente, inestimable estímulo para el desarrollo del pensamiento científico, perseverancia y paciencia con mi persona.

Al Dr. D. Fernando Jiménez Arrosagaray, por su permanente ayuda, ánimo y facilidades ofrecidas para la continuidad del presente trabajo.

Al Dr. D. Javier Lirón de Robles Pérez Jefe del Servicio, José García Funes, Luis Luelmo Granados, Cristobal Arjona Manuel, José Paez Serrano, Servicio de Dermatología, Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla".

Al Dr. D. Santiago Vidal Asensi, por su voto de confianza en mis inicios como residente en el servicio, por haberme iniciado en la línea de investigación y por su incansable perseverancia para que iniciara y culminara lo que yo he llamado "mi asignatura pendiente". Él le quito hierro al asunto y me la hizo ver de otro color.

Al Dr. D. Carlos Gutiérrez, sabedor de incalculables conocimientos, inagotable fuente de información, por su ayuda y rigurosidad en la interpretación estadística, por haberme prestado una generosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Dña. Maivi García Rosado, por su impagable contribución, implícita y explícita, en este propósito.

A todo el servicio de Medicina Preventiva del Hospital Gómez Ulla por su ánimo y comprensión.

Al servicio de Anatomía Patológica, especialmente al Prof. Dr. D. Santiago Coca Menchero, Dr. Merino y Dra. Izquierdo por esclarecer mis dudas referentes a la clasificación histológica.

Al personal de enfermería y auxiliar, Dña. Ma. Luz Bayón, Dña. Rosalia Fernandez Prieto, Dña. Francisca López Cancho y Dña. Pilar Tejeda Parra, con quienes he trabajado en estos años, por haberme ayudado a desarrollar mi profesión y porque no puede entenderse algo tan personal e íntimo como el trato con el enfermo sin el respaldo de un colectivo como este.

A Dña. Raquel Quintano Merino y Dña. Pilar Ros Muñarriz en las preparaciones de las piezas a estudio, Laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla”.

A los pacientes, porque son ellos quienes nos proporcionan, con sus padecimientos y vivencias, lo fundamental en nuestro trabajo: enseñanzas y preparación para el siguiente caso clínico.

A todos mis amigos que, directa o indirectamente, han estado a mi lado durante todo este tiempo, en el que me han ofrecido su amistad sin pedir nada a cambio.





## INDICE

|   |               |
|---|---------------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>- 2 -</b>  |
| CAMPO DE CANCERIZACIÓN  | - 7 -         |
| LA PROTEÍNA p53   | - 8 -         |
| MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR: EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67  | - 15 -        |
| RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA TERAPIA FOTODINÁMICA Y p53/Ki-67                                | - 19 -        |
| COLÁGENO IV   | - 20 -        |
| <b>HIPOTESIS</b>  | <b>- 22 -</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>- 24 -</b> |
| <b>SUJETOS Y MÉTODOS</b>  | <b>- 26 -</b> |
| DISEÑO  | - 26 -        |
| POBLACIÓN A ESTUDIO   | - 26 -        |
| <i>Tamaño muestral</i>  | - 26 -        |
| <i>Muestreo</i>   | - 26 -        |
| <i>Criterios de inclusión</i>   | - 26 -        |
| <i>Criterios exclusión</i>  | - 27 -        |
| <i>Aspectos éticos</i>  | - 27 -        |
| VARIABLES A ESTUDIO   | - 27 -        |
| MATERIAL  | - 33 -        |
| MÉTODOS   | - 35 -        |
| <i>Método de biopsia</i>  | - 35 -        |
| <i>Método aplicación de la crema y luz</i>  | - 35 -        |
| <i>Método de cuantificación de grosores de epidermis y dermis</i>                           | - 35 -        |
| <i>Método de cuantificación de infiltrado inflamatorio</i>                                  | - 37 -        |
| <i>Metodología del estudio</i>  | - 37 -        |
| <i>Método fotográfico</i>   | - 39 -        |
| ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO   | - 40 -        |
| TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)  | - 40 -        |
| ANTICUERPOS UTILIZADOS  | - 41 -        |
| <i>Anticuerpos primarios</i>  | - 41 -        |
| <i>Anticuerpos secundarios</i>  | - 41 -        |
| <i>Técnica de ihq</i>   | - 41 -        |
| <i>Valoración de las preparaciones</i>  | - 43 -        |
| <i>P53</i>  | - 44 -        |
| <i>Ki-67</i>  | - 45 -        |
| <i>Colágeno IV</i>  | - 46 -        |
| MÉTODO ESTADÍSTICO  | - 47 -        |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>- 49 -</b> |
| CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA   | - 49 -        |
| EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TFD SOBRE LA EPIDERMIS, DERMIS E INFILTRADO INFLAMATORIO         | - 59 -        |
| EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TFD SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53, Ki-67 Y COLÁGENO IV | - 63 -        |
| -   | -             |
| <b>DISCUSIÓN</b>  | <b>- 68 -</b> |
| <i>Hallazgos histológicos</i>   | - 70 -        |
| HEMATOXILINA & EOSINA   | - 70 -        |
| COLÁGENO IV   | - 71 -        |
| EXPRESIÓN DE p53  | - 71 -        |

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| EXPRESIÓN DE Ki-67 .....              | - 72 -        |
| IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS ..... | - 74 -        |
| LIMITACIONES DEL TRABAJO .....        | - 74 -        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>             | <b>- 77 -</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>             | <b>- 84 -</b> |



# INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

---

La queratosis actínica es la lesión premaligna o maligna in situ más frecuente en la piel.

Aparece en el ser humano tras una exposición crónica a la luz solar y lo hace en las zonas fotoexpuestas, sobre todo la cara, el cuero cabelludo alopécico, el dorso de las manos, la zona del escote y las piernas.

La intensidad de la exposición solar acumulada, la piel clara -fototipos bajos- y la edad son determinantes del desarrollo de dicha lesión, que en la mayoría de los casos es múltiple y coexiste con otras lesiones desencadenadas por la radiación solar -lentigo solar, telangiectasias, elastosis, etc.-.

La presentación clínica habitual es pequeñas placas eritematosas, cubiertas por escamas duras o costras, en ocasiones pigmentadas. Muestran un aspecto erosivo o hiperqueratosis intensa que llega a formar cuernos cutáneos. Su larga evolución y su localización facilitan el diagnóstico (FIGURA 1).



FIGURA 1. QUERATOSIS ACTÍNICA EN CUERO CABELLUDO ALOPÉCICO.

Respecto a la anatomía patológica, en las capas inferiores de la epidermis se observa atipia citológica que puede asociarse a hiperplasia de células basales o a una atrofia precoz, con adelgazamiento difuso de la superficie epidérmica de la lesión. En la dermis existen fibras elásticas engrosadas de color gris azulado -elastosis- como consecuencia de una síntesis anómala de fibras elásticas dérmicas por parte de los fibroblastos alterados por el sol de la dermis superficial. El estrato córneo está engrosado y, a diferencia de lo que sucede en la piel normal, las células de esta capa conservan sus núcleos -paraqueratosis-. Algunas lesiones, aunque no todas, evolucionan

hacia una atipia que afecta a todo el grosor de la epidermis, lo que permite clasificarlas como carcinomas espinocelulares (CE) *in situ*.

No todas las QA se transforman con el tiempo en cánceres cutáneos -por lo general, en CE-, sin embargo se ha calculado que hasta un 16 % de éstas lo hacen cada año,<sup>1,2,3,4</sup> lo que justifica la erradicación local de las mismas.

Las opciones de tratamiento disponibles incluyen la cirugía, la crioterapia, el tratamiento tópico y la TFD.<sup>5</sup> La elección del tratamiento se ve determinada por la localización, el tamaño, el tipo y la naturaleza de la lesión -lesión primaria o recurrente-, así como la preferencia del paciente, su estado de salud y movilidad.

La crioterapia es el tratamiento más común para las QA, especialmente cuando hay un número reducido de lesiones y se encuentran en las extremidades.<sup>6</sup> El tejido se destruye por congelación mediante la pulverización abierta de nitrógeno líquido. El tejido muerto se va desprendiendo en las siguientes semanas al tratamiento. Es una técnica rápida, fácil, económica y de alta eficacia para un número pequeño de lesiones, pero produce dolor, molestias y también destruye tejido sano adyacente. Puede producir cicatrices y pérdida de pigmentación.

Existen cuatro técnicas quirúrgicas principales:

- 1) Curetaje: de elección para lesiones superficiales, consiste en el raspado de la superficie con un escalpelo o cureta.
- 2) Escisión elíptica: se trata de la extirpación de la lesión bajo anestesia local y cierre de la herida.
- 3) Escisión seguida de cirugía reconstructiva: para heridas grandes.
- 4) Cirugía micrográfica de Mohs: consiste en escindir y examinar al microscopio de forma sistemática finas capas de tejido, con una cantidad mínima de tejido sano. Estas técnicas presentan altas tasas de curación y permiten el análisis microscópico, pero requieren de anestesia, tiempo, un especialista formado y los resultados cosméticos dependerán de la habilidad del mismo. El coste, además, es elevado. La excisión se termina cuando todas las zonas del tejido están sanas.

Se dispone de 3 tipos de tratamientos tópicos:<sup>7</sup>

- 1) 5-fluoruracilo (5-FU): el paciente se aplica la crema una o dos veces al día durante 2-8 semanas. Pueden tratarse zonas amplias y da buenos resultados cosméticos a largo plazo, pero es muy irritante, puede producir úlceras, hinchazón, cicatrices y debe evitarse la luz UV durante el tratamiento, por lo que existen bajas tasas de cumplimiento de dicho tratamiento por parte del paciente.
- 2) Imiquimod al 5% (Aldara®): es un inmunomodulador tópico que se aplica el paciente sobre la zona afectada y la piel adyacente 5 veces a la semana durante 6 semanas. Se obtienen buenos resultados cosméticos a largo

plazo y requiere pocas visitas al médico, pero puede resultar localmente muy doloroso e irritante, lo que provoca que el paciente no cumpla de forma estricta el tratamiento. Su coste es elevado.<sup>8</sup>

- 3) Gel de diclofenaco (Solaraze®): es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que se aplica el propio paciente 2 veces al día durante 2-3 meses. Es un tratamiento no invasivo que genera buenos resultados cosméticos a largo plazo pero también puede ser irritante, puede dar efectos adversos locales y se debe evitar la exposición a la luz UV. No se disponen de datos a largo plazo.

La TFD es una innovadora modalidad para el tratamiento del CCNM y la QA.<sup>9</sup> Se basa en las propiedades del MAL (FIGURA 2). Es un antineoplásico que induce la acumulación selectiva de porfirinas fotoactivas en el tejido enfermo, preservando el sano. Las porfirinas se activan con luz -longitud de onda de 570-670 nm- y en presencia de oxígeno se produce una reacción fotodinámica y la destrucción de las células tumorales dejando el tejido sano intacto (FIGURA 3).

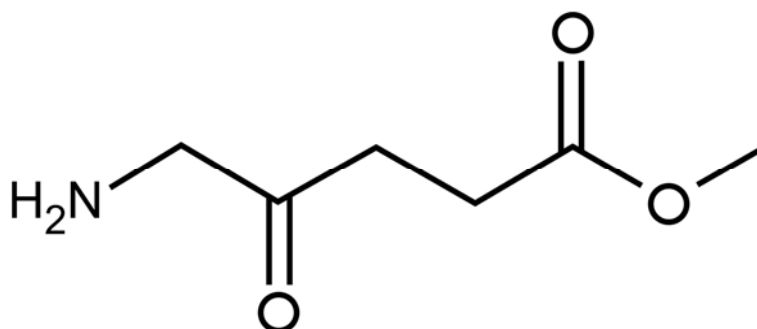


FIGURA 2. MOLÉCULA DE MAL.



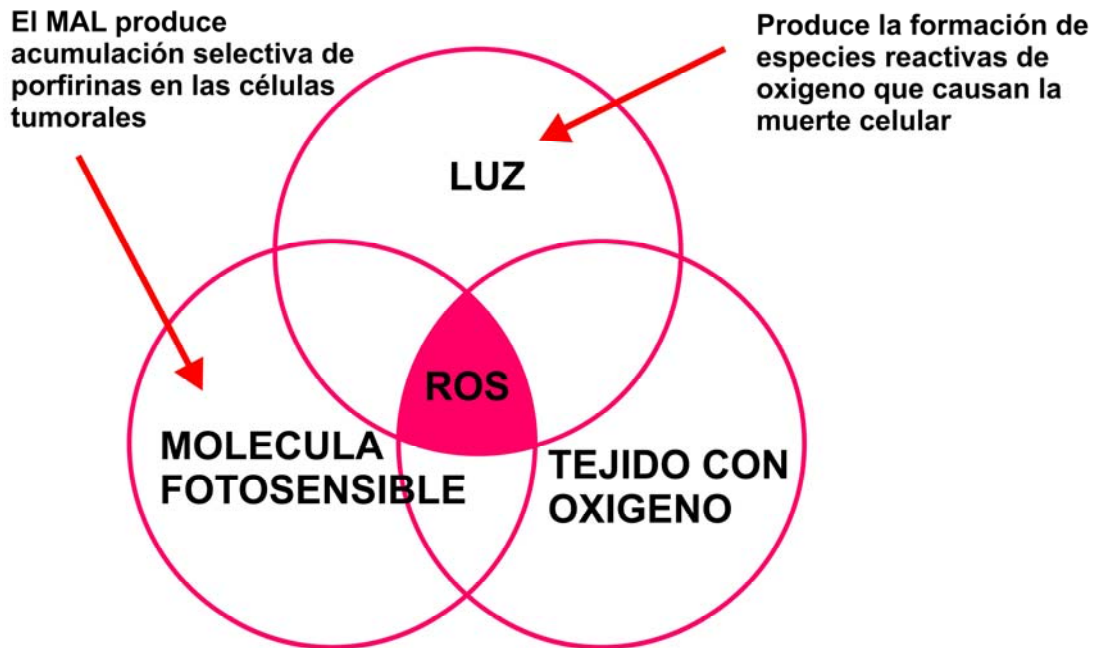


FIGURA 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TFD.

Las Porphirinas fotoactivas acumuladas en los tejidos enfermos emiten una luz rosada al ser iluminadas con la Lámpara de Wood -luz ultravioleta de longitud de onda 340-450 nm-.

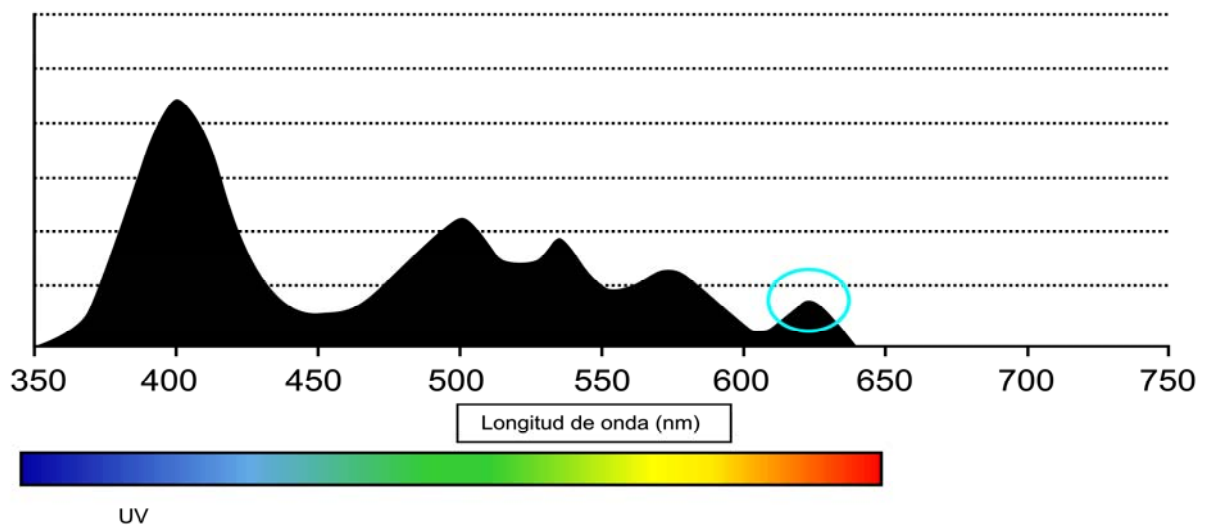


FIGURA 4. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE PORFIRINAS.

El espectro de absorción de las porfirinas tiene su máxima excitación a los 410 nm, con 4 pequeños picos en 510, 530, 580 y 630 nm. La especificidad de la TFD depende de la utilización de luz con longitud de onda que corresponda a los picos de absorción del fotosensibilizador y que permita la penetración tisular apropiada al proceso patológico. Como la QA es una displasia epidérmica de espesor parcial, superficial, todas las longitudes de onda de los picos de absorción de luz son apropiadas,

con la máxima penetración de la epidermis con longitudes de onda de 630 nm (FIGURA 4).

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- 1) Preparación de la lesión: las 2 semanas previas el paciente debe aplicarse vaselina de ácido salicílico al 10%. El día del tratamiento se realiza curetaje de escamas y costras.
- 2) Aplicación de la crema: se aplica la crema y se cubre el área con un vendaje oclusivo y opaco -para evitar la activación del principio activo con la luz solar-
- 3) Tiempo de espera para la absorción: 3 horas.
- 4) Iluminación: con luz de longitud de onda 635 nm. Se puede aliviar el calor con un ventilador y una gasa empapada en agua.
- 5) Cuidados post-tratamiento: protección solar de la zona tratada durante 2 días.

Se trata de un procedimiento selectivo, no invasivo, con el cual se pueden tratar varias lesiones al mismo tiempo. Es un tratamiento controlado por el médico y da lugar a resultados médicos y cosméticos muy buenos.<sup>10</sup> Requiere varias sesiones y un tiempo de espera largo para la absorción de la crema, se han descrito efectos secundarios al tratamiento como eritema, descamación, formación de costras y celulitis.<sup>11</sup> Estos efectos son poco relevantes y desaparecen en los siguientes días. No se han descrito efectos secundarios sistémicos ni interacciones con otros medicamentos.

Este método de tratamiento se elige en función del número de lesiones y de la severidad de las mismas,<sup>12,13</sup> teniendo en cuenta los antecedentes personales del paciente en relación con cánceres cutáneos y factores de riesgo para el desarrollo de los mismos.

En el Servicio de Dermatología y Venereología de nuestro hospital se ha elaborado un algoritmo de toma de decisiones para el tratamiento de QA con TFD que ya ha sido presentado en el Congreso Nacional de Dermatología y el Congreso Europeo de TFD (FIGURA 5).

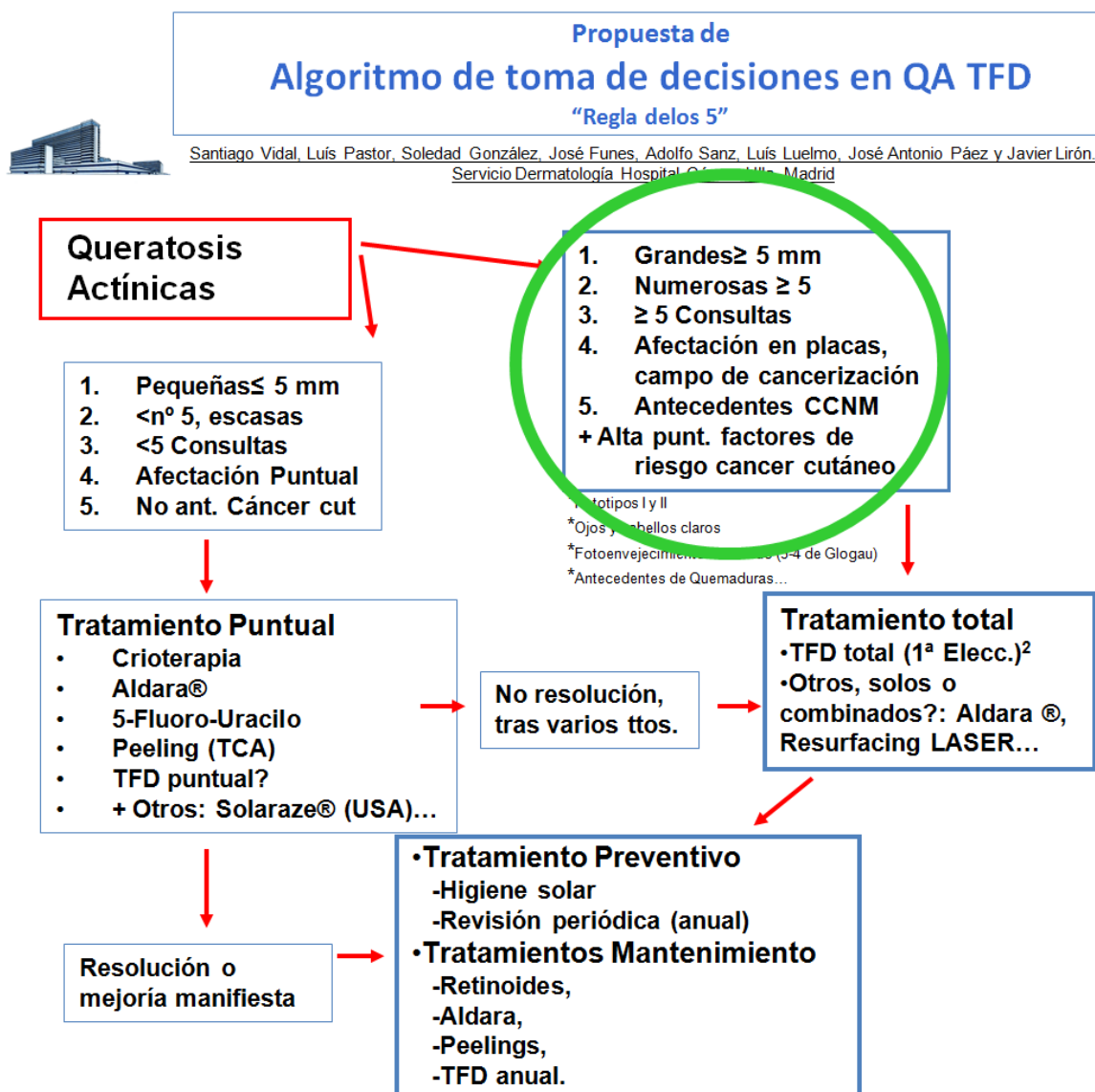


FIGURA 5. ALGORITMO DE TOMA DE DECISIONS EN QA TFD.

Los resultados hasta ahora obtenidos con este tratamiento lo hacen ser de elección por pacientes<sup>14,15,16</sup> y profesionales para el tratamiento de áreas extensas de QA. Estudios realizados confirman la buena relación coste-efectividad de tratamiento con TFD.<sup>17</sup>

## CAMPO DE CANCERIZACIÓN

El concepto "campo de cancerización" fue acuñado por Slaughter en 1953.<sup>18</sup> Previamente el mismo autor planteó que el inicio de un cáncer se daba por un proceso anaplásico que afecta a varias células simultáneamente, y no un cambio a nivel de una única célula. Llegó a la observación de que los epitelios circundantes a tumores presentaban más de un área de malignidad. La sospecha venía debido al efecto de la exposición al carcinógeno porque no se conocía la causa molecular de este fenómeno.

Por tanto y sabiendo que el carcinógeno más importante en la piel es la radiación UV, claramente asociada con los tumores cutáneos en su iniciación, promoción y progresión. Produce cambios genéticos y moleculares la irradiación crónica de la piel en toda la superficie afecta. Cambios presentes incluso en ausencia de lesión clínica. Considerándose que la QA es una enfermedad "de campo", no una lesión aislada clínicamente, sino que traduce el daño genético y molecular que tienen lugar en los tejidos expuestos, en la piel, a los UV.<sup>19</sup>

A renglón seguido se describen las alteraciones moleculares descritas en piel fotoexpuesta, reflejando el campo de cancerización.

---

### LA PROTEINA p53

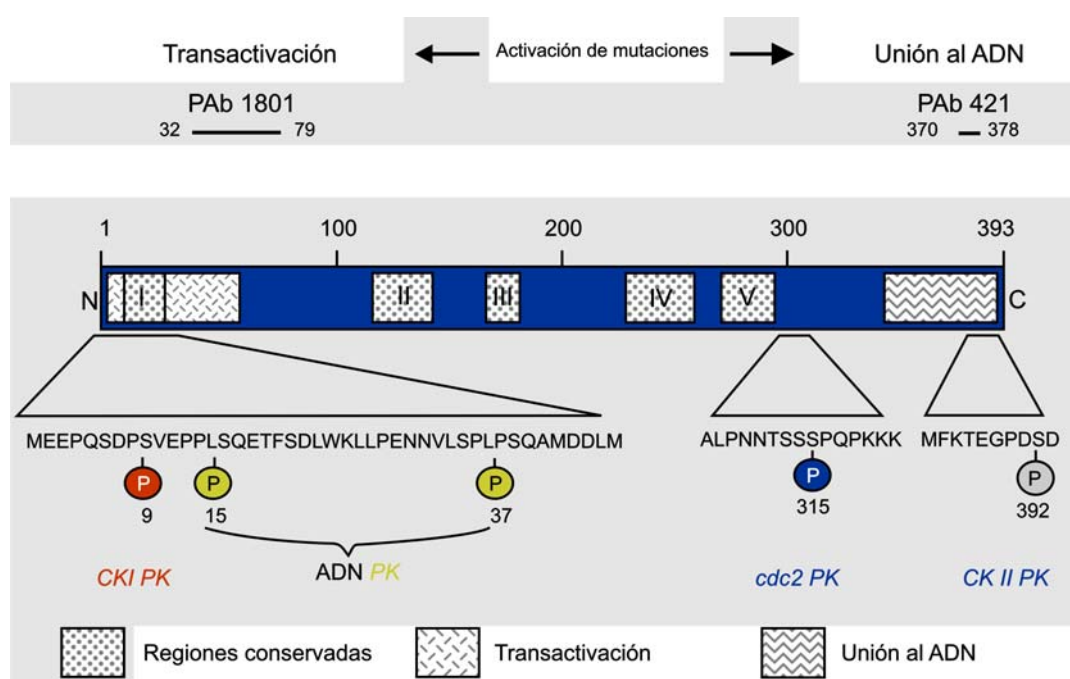
---

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear de 53 kDa y 393 aminoácidos.<sup>20</sup> En ella se pueden reconocer tres regiones de residuos de serina fosforilables.<sup>21</sup> Fue descubierta por Lane y Crawford en 1979,<sup>22</sup> a partir de extractos de células eucarióticas de murinos y que reaccionaban con anticuerpos inducidos por el virus simio SV-40; encontrándose unida a complejos proteínicos oncogénicos, denominados «gran antígeno T», formados en las células transformadas.

Análisis estructurales de la secuencia aminoacídica del p53 -proteína «wild-type» p53, o p53wt- (FIGURA 6), encuentran en su carboxilo terminal un dominio de hélice contra hélice característico de las proteínas que se unen al DNA, constituido por los aminoácidos 319 al 393 finales.<sup>20,23</sup>

Los aminoácidos del extremo N-terminal -los primeros 80 aminoácidos- son ácidos, con una conformación alfa helicoidal capaz de fusionarse con la molécula de ácido desoxiribonucleico(DNA) u otras proteínas;<sup>24</sup> con el resultado de promover la síntesis de ácido ribonucleico mensajero(RNAm), a través de su unión a las secuencias de nucleótidos en posición 5' de la hélice de DNA, o de reprimirla.<sup>18,21,22</sup>

El efecto de la proteína p53 puede estar influenciado por modificaciones en el propio gen que la codifica; por modificaciones postranscripcionales, tales como la fosforilación; o por interacciones con otras proteínas celulares o víricas (FIGURA 6).<sup>25</sup> En este sentido, se atribuye a la proteína mdm2 una acción inhibitoria, por su unión con la proteína p53.<sup>26</sup>

FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE LA PROTEÍNA p53.<sup>27</sup>

La proteína p53 está asociada con la cinasa del ciclo celular p34cdc2,<sup>28</sup> y sería inducida durante la transición de la fase G0 a G1,<sup>29</sup> regulando el inicio de la replicación del DNA en la fase G1-S.<sup>30</sup> El p53 interviene en el control de la proliferación y diferenciación celular, síntesis y reparación del DNA, plasticidad genómica, y muerte celular programada.<sup>31,32</sup>

Daños en el DNA de las células somáticas, causados por irradiación o por inhibidores de la topoisomerasa, estabilizan la p53wt,<sup>33</sup> produciendo la detención del ciclo celular en la fase G1 -periodo de tiempo anterior a la síntesis de DNA y mitosis-.<sup>33</sup>

Durante la detención del ciclo celular se produce la reparación de las hebras de DNA, reduciéndose de esta manera la probabilidad de mutaciones.<sup>34</sup> Si la reparación no es exitosa, la p53 promueve la muerte celular por apoptosis, previniendo la propagación de defectos genéticos a las sucesivas generaciones celulares, (FIGURA 7).<sup>35</sup>

La proteína p53 mutante no es capaz de actuar como factor de transcripción en la detención de la fase G1; dando como resultado la progresión de células anómalas cancerosas.<sup>36,37</sup> Por este motivo se ha considerado al gen de la proteína p53 como un «policía molecular», guardián del genoma,<sup>30</sup> dedicado a preservar la integridad genómica.<sup>30,33</sup> Shaulsky refiere que en células con detención de su crecimiento,<sup>38</sup> la proteína p53 se localiza fundamentalmente en el citoplasma, haciéndose más evidente con la progresión a la fase S; después es identificada en el núcleo en el inicio de la síntesis del DNA; decreciendo en intensidad a lo largo de las horas; para volver a presentar acumulo citoplasmático a las 24 horas. En condiciones normales, las células pueden presentar una ligera tinción citoplasmática «patrón de membrana».<sup>39</sup>

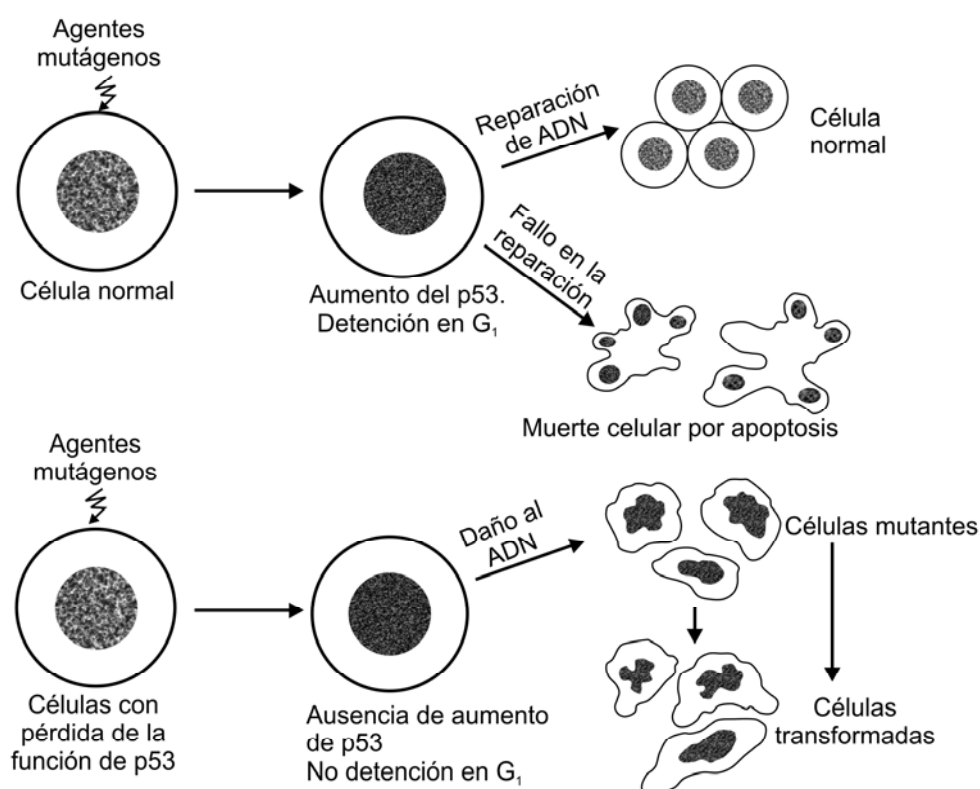


FIGURA 7. MODELO DE ACCIÓN PROPUESTA DEL P53 NORMAL Y MUTANTE.<sup>34</sup>

La proteína p53 está codificada por el gen Tp53, que está formado por 16-20 kb de DNA, y constituido por 11 exones y 393 codones; encontrándose localizado en el brazo corto del cromosoma 17, en la posición 17p 13.1.20,<sup>40,41</sup> Su RNA-mensajero presenta un tamaño de 2,2-2,5 kb, expresándose en todas las células del organismo.<sup>21,42</sup>

El gen Tp53 pertenece al grupo de los genes supresores,<sup>19</sup> la función exacta de los genes supresores no es aún bien conocida, pero existe evidencia de la misma en el control del contacto celular, regulación de la transcripción e inhibición de determinados oncogenes.<sup>18,43,44</sup>

Las mutaciones encontradas en el gen Tp53 de células cancerosas, producen proteínas mutadas que no se unen eficazmente a las secuencias específicas de DNA, y no promueven la transcripción de genes dependientes de Tp53 -pérdida de función-.<sup>45</sup>

Actualmente se tiende a pensar que el gen p53 se comporta como un gen recesivo -característico de los genes supresores-, ya que en ocasiones este gen pierde su acción fisiológica cuando existe mutación en un alelo y pérdida parcial del restante, mutación de los dos alelos, o pérdida de ambos,<sup>46</sup> actuando de forma recesiva frente a sus productos no mutados.<sup>23</sup>

Sin embargo, algunas mutaciones del gen p53 son más típicas de oncogenes, con función dominante -ganando función-.<sup>47</sup> Dittmer señala al respecto que las proteínas mutadas pueden adquirir nuevas funciones fenotípicas, pudiendo inducir la aparición de tumores.<sup>48</sup>

Si bien en su inicio a la proteína del gen p53 se le atribuyeron propiedades oncogénicas,<sup>49,50</sup> actualmente se conoce que posee atributos antioncogénicos, basados en la observación de que la forma no transformada de la proteína p53 o «wild type» - p53wt-, inhibe la transformación de células de roedor, suprimiendo la activación de conocidos oncogenes, tales como el Hras y el E1B.<sup>51,52,53</sup>

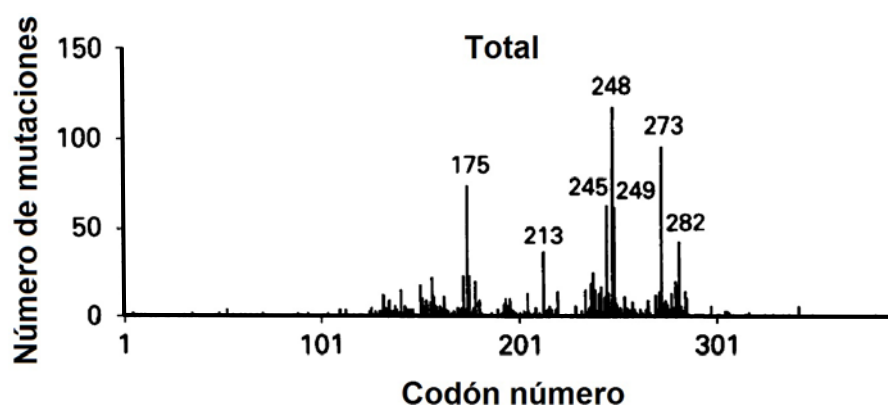
La proteína p53wt tiene una vida media de 5 a 30 minutos, de manera que se detecta en muy bajas concentraciones en los tejidos normales.<sup>46,54,55</sup> Sin embargo, las proteínas mutadas son más estables y tienen una vida media más prolongada, pudiendo durar horas,<sup>51,55,56,57</sup> por lo que se produce una acumulación de la proteína mutada en las células, que hace posible su detección mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales.<sup>58,59,60,61</sup>

La proteína p53 mutada tiene capacidad para formar complejos tetraméricos con la p53wt; y estos complejos «mutante-wt» p53, demostrados por Finlay,<sup>62</sup> producen la inactivación de las funciones de la proteína p53wt.<sup>60</sup>

La detección de p53 en el tejido tumoral, por medio de métodos inmunohistoquímicos, revela generalmente que es la proteína mutada, -debido a su acumulación intranuclear por su mayor vida media-, la que se encuentra presente; como reflejo de la correspondiente mutación en el gen que la codifica.<sup>56,58,59,63,64,65</sup>

Cerca del 60% de los cánceres humanos tienen mutaciones en el gen p53.<sup>23</sup> El 85% de las mutaciones en el locus p53 son del tipo «missense»<sup>23,46</sup> reemplazamiento de un aminoácido por otro, como consecuencia de simples cambios mutacionales de bases a lo largo de la secuencia de DNA, con aparición de una proteína alterada.<sup>46</sup> Sólo el 8% de las mutaciones de p53 son deleciones o inserciones, y el 5,5% corresponden a mutaciones «nonsense».<sup>23</sup>

Los cambios mutacionales frecuentemente consisten en transiciones -sustitución de una base púrica por otra también púrica, o una pirimidínica por otra pirimidínica- y en tranversiones -sustitución de una base púrica por una pirimidínica, o viceversa-.<sup>18,21</sup>



**Espectro de 1447 mutaciones en la proteína p53 de todos los tipos de tumores humanos**

FIGURA 8. ESPECTRO MUTACIONAL EN LA PROTEÍNA p53 EN EL CONJUNTO DE TUMORES HUMANOS.<sup>23</sup>



La gran mayoría de las mutaciones de Tp53 (92%) se encuentran localizadas entre los codones 120 y 290 (FIGURA 8);<sup>23</sup> exones 5 a 8;<sup>55</sup> siendo esta una región selectiva de mutaciones missense, mientras que las nonsense comúnmente se encuentran fuera de esta región.<sup>23</sup>

Las anomalías en el gen p53 pueden detectarse por técnicas de biología molecular, empleando amplificación oligonucleótida con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta es una técnica específica y sensible, pero laboriosa, cara, susceptible de error por contaminación, y no siempre completa en su aplicación metodológica.<sup>61</sup>

Más sencillas, económicas y al alcance de cualquier laboratorio de Anatomía Patológica, son las técnicas inmunohistoquímicas de detección de la proteína p53 mutada -acumulada-, en el núcleo de las células transformadas -tumorales-, mediante el empleo de anticuerpos específicos. Debido a que las mutaciones en el gen p53 no están restringidas a un solo locus, se han desarrollado distintos anticuerpos frente a la proteína p53.

Los anticuerpos anti-p53 más frecuentemente utilizados para tumores sólidos incluidos en parafina -todos ellos monoclonales- son los siguientes: el anticuerpo «PAb 1801», que reacciona frente a la p53wt y p53 mutada, reconociendo un epitopo situado entre los aminoácidos 32 al 79;<sup>66</sup> el «D07», que reacciona frente a la p53wt y p53 mutada, reconociendo un epitopo situado entre los aminoácidos 35 a 45;<sup>67</sup> y el «PAb 240» que identifica un epitopo situado entre los aminoácidos 156 a 335.<sup>68</sup> También se han desarrollado otros anticuerpos para tejidos en congelación, como el policlonal «CM1»;<sup>69</sup> e incluso uno específico para la «wild-type p53»: el «PAb 1620».<sup>70</sup>

Ocasionalmente se ha observado positividad de expresión -inmunorreactividad frente a la p53- en algunos tumores que no acarrean mutaciones «missense» del gen;<sup>71,72</sup> así como también en células basales de algunos epitelios de tejidos normales como la mucosa esofágica y el exocervix;<sup>73</sup> y en lesiones como la metaplasia escamosa del trigono vesical, mastopatía fibroquística y los queloides.<sup>71</sup> Este fenómeno se atribuye a la estabilización de la wtp53 por unión a otras proteínas.<sup>74,75</sup>

Y de forma inversa, pueden resultar indetectables los niveles de p53 por técnicas inmunohistoquímicas en tumores con mutaciones «nonsense» -en secuencias de encodamiento, en el extremo terminal de la cadena de DNA-, porque cuando estas alteraciones suceden, la proteína resultante se encuentra ausente, truncada o inestable.<sup>63</sup> En otras ocasiones la ausencia de expresión de proteína p53 puede ser debida a que se haya producido una importante delección de ambos alelos cromosómicos por mutaciones sucesivas, conduciendo a un codón stop.<sup>76</sup>

Aunque la alteración del gen p53 puede observarse en algunas lesiones displásicas, sin embargo generalmente aparece más tardíamente, en neoplasias ya desarrolladas,<sup>63,77</sup> manteniéndose a través de su progresión tumoral.<sup>78</sup> Debido a la variabilidad morfológica y etiológica observada entre los diferentes tumores, y en particular en los de vejiga, surgidos todos ellos de un mismo epitelio, se ha sugerido la existencia de múltiples caminos en la génesis y desarrollo de estos tumores.<sup>63,79</sup>



El espectro de mutaciones en el gen p53 guarda implicaciones epidemiológicas, observándose correlación entre algunos agentes etiológicos ambientales y determinadas mutaciones.<sup>80,81</sup> En este sentido, se ha identificado que la presencia de «infrecuentes-«dobles mutaciones» en el gen p53 ocurren solamente en pacientes fumadores;<sup>79</sup> y que el patrón de mutaciones del Tp53 demostrado en otros tumores.<sup>78</sup>

Ishikawa propuso en 1.991 un modelo de génesis y progresión en determinados tumores basado en la delección del cromosoma 9 y en las mutaciones del gen p53 (FIGURA 9).<sup>82</sup> Este modelo se soporta sobre la base de la frecuente identificación de delecciones en ambos brazos del cromosoma 9, en el que al menos dos genes supresores relacionados con el desarrollo del carcinoma se encuentran localizados.<sup>83,84</sup>

Así mismo, son muy frecuentes las mutaciones del gen p53 en otros tumores, pudiéndose identificar en más del 50% de estos.<sup>85,86</sup> La acumulación de la proteína mutada p53 ha sido relacionada con la invasión muscular,<sup>87,88</sup> y con el grado tumoral;<sup>25,85</sup> habiéndose asociado al riesgo de progresión en tumores superficiales.<sup>87,80,89,84,90,91</sup>

Otro hecho que ha implicado al gen p53 en el desarrollo tumoral, es la presencia de alteraciones en dicho gen en tejidos aún morfológicamente normales y displásicos, con tumores multifocales y recidivantes; sugiriendo que esos focos de positividad del p53 pueden representar tempranos cambios genéticos de un nuevo foco neoplásico.<sup>88, 92,93</sup>

Recientemente Gao y col.<sup>52</sup> han publicado el papel que ejerce la alteración - mutaciones y delección- del gen p53 en la iniciación y progresión tumoral: «Con expresión de proteína p53 mutada, que une y estabiliza a la wild-type p53 endógena, se inducen alteraciones nucleares, dando lugar a cambios de hiperplasia y displasia. El déficit de wt-p53 predispone a la proliferación; pero es necesaria la ausencia completa de función de p53wt como requisito colaborador para que el H-ras promueva la tumorigénesis».

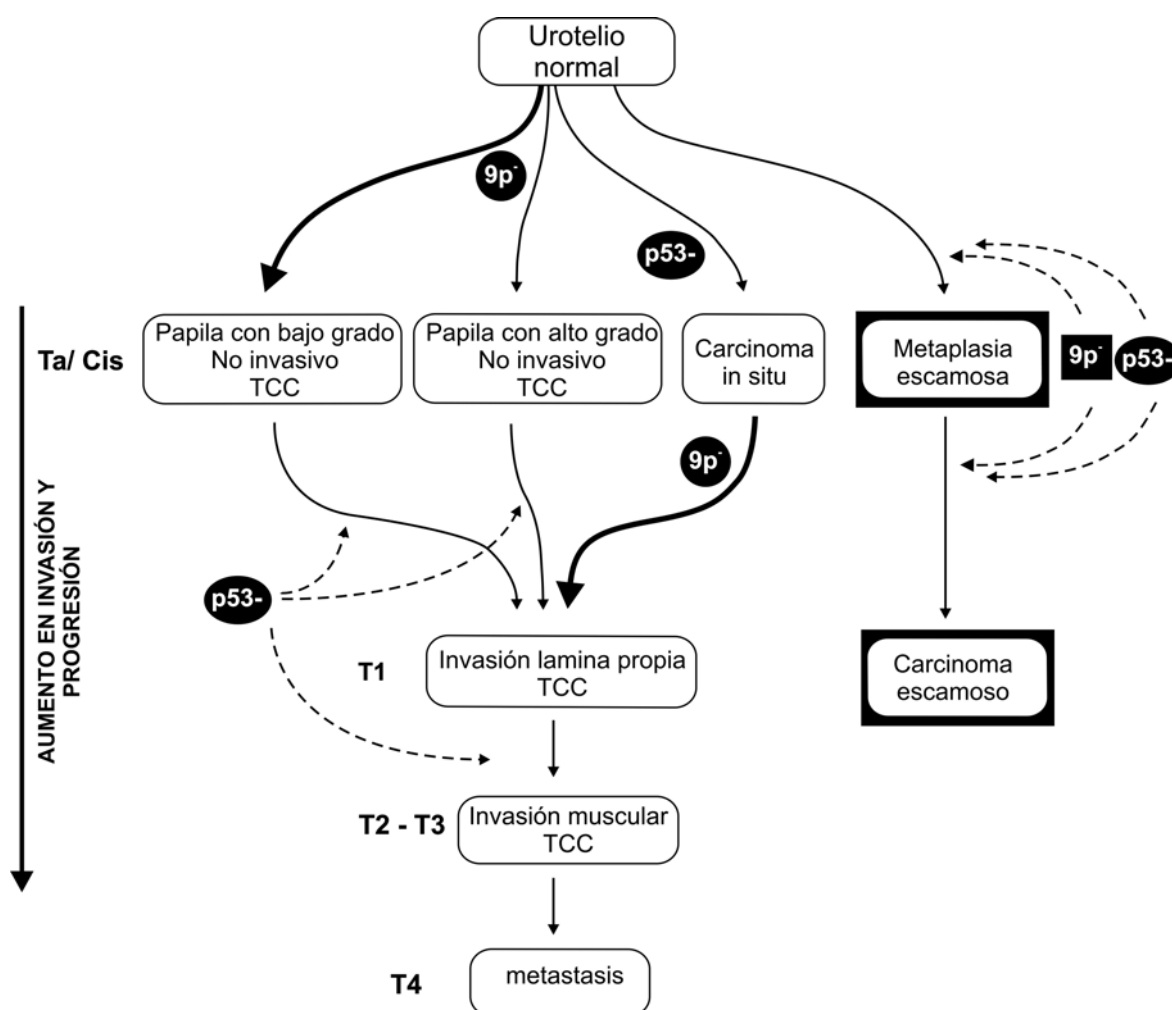


FIGURA 9. MODELO DE PROGRESIÓN PROPUESTO EN EL CARCINOMA UROTELIAL DE VEJIGA. MODIFICADO DE ISHIKAWA.<sup>94</sup>

La proteína p53 está mutada en piel sana fotoexpuesta,<sup>95</sup> en la mitad de las QA y de CB, llega hasta un 90% en los CE.<sup>96</sup> Apoyando su implicación en el CCNM, en fases iniciales del proceso de oncogénesis.<sup>97</sup>

Más de 150.000 mutaciones de diferentes orígenes se han descrito, frecuentemente se detectan regiones en las que las mutaciones se producen, son denominados “hotspots” -codones 177, 196, 245, 248 y 278-. El codón 248 en el caso de CCNM es el más frecuentemente afectado, donde se sustituye una arginina por triptófano, el 278 es más específico del CE. Puede tener dos mutaciones diferentes un mismo tumor, una en cada alelo.<sup>98</sup> Se ha visto que el espectro de mutaciones entre el CE y el CB presentan diferencias estadísticamente significativas.<sup>99</sup> Parece que sirve como marcador de ultravioleta B (UVB) y no ultravioleta A (UVA) la mutación del p53.<sup>100</sup>

Mucho antes de la aparición clínica e histológica de la lesión, aparece la mutación en el p53, tanto en QA o CE. Tras 4 semanas irradiados con UVB a ratones se pueden observar mutaciones en el p53, con aparición de tumores hasta 20 semanas después de

la exposición.<sup>101</sup> En la superficie cutánea dañada se da en forma de agregados, con células "mutadas" de tal modo se pueden hallar miles de clones de células con el p53 mutado en piel fotoexpuesta clínicamente sana. Representa a un clon único, cada lesión -QA- en un único paciente, derivado de uno de estos agregados, portador de una mutación diferente. Confieren diferentes grados de capacidad para la supervivencia o la proliferación a los progenitores de queratinocitos las diferentes mutaciones en el p53. La agresividad del CE no se ha conseguido correlacionar con el tipo de mutación en el p53, esto explica que la progresión tumoral probablemente sean pasos posteriores a la mutación del p53.<sup>102</sup> Tras la interrupción de la irradiación UVB en ratones, Melnikova y col. observaron que, desaparecía el clon mutado en algunos casos, debido a descamación y diferenciación de la epidermis en unos, y en otros, la mutación tuvo lugar probablemente en células progenitores de queratinocitos, persistiendo la mutación, con aparición de tumores cutáneos tipo CE. Un gen mutado por UVB, incluso en la infancia, en la edad adulta puede contener esta mutación en un eventual tumor que se produjera. Observaron que se retrasaba pero no evitaba el desarrollo de tumores en los ratones, con la interrupción de la irradiación.<sup>103</sup>

Es necesaria la expansión clonal de los agregados portadores de cierta mutación en el p53 para el desarrollo de una QA o un CE, para que futuras mutaciones sigan contribuyendo al desarrollo de la lesión aumentando la superficie de "tejido diana". En la expansión clonal selectiva de las células portadoras del p53 mutada se ha propuesto que existe dos mecanismos que subyacen. Una fisiológica, que es la resistencia adquirida por estas células a la apoptosis inducida por UV. Las células portadoras de la mutación no sufren muerte celular ocupando los queratinocitos normofuncionantes los espacios dejados, -serían las denominadas células en huevo frito- que sufrirían apoptosis.<sup>104</sup> En comparación con el resto de queratinocitos normales, se propone que estas células con el p53 mutado presenten una mayor capacidad proliferativa.<sup>101</sup>

En piel fotoexpuesta, pretumoral y tumoral la expresión del p53 es patente.<sup>105</sup> Dándose en forma de agregados, presentes en el campo de cancerización, representando los clones de células portadoras del p53 mutado.

---

## MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR: EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67

---

El antígeno fue descubierto durante la producción de anticuerpos específicos para antígenos nucleares de células de linfoma Hodgkin -línea L428-.<sup>106</sup> El anticuerpo monoclonal Ki-67 reconoce un antígeno de proliferación celular conocido como «antígeno Ki-67», que se detecta solamente en las células incluidas en el ciclo celular.<sup>92,107,108,109</sup>

Gerdes lo puso en evidencia y su utilización es muy amplia,<sup>106</sup> pero la estructura y función del mismo no son bien conocidas todavía.<sup>110</sup>

El antígeno Ki-67 no es específico de la especie humana. Se ha encontrado en simios, conejo, rata y cordero.<sup>111,112</sup> Tampoco es específico de un determinado tejido u órgano de la Economía.<sup>113</sup> Todas las células en proliferación muestran positividad para el anticuerpo Ki-67, excepto las células recientemente proliferadas, como las profundas de las criptas intestinales,<sup>99</sup> o las células de la médula ósea normal, a pesar de ser un tejido muy proliferante.<sup>114</sup>

Se trata de una proteína no histona, de peso molecular 345 y 395 kDa,<sup>95,115</sup> (FIGURA 10), correspondientes a dos subunidades; que presenta similitudes con la ADN topoisomerasa II.<sup>116,117</sup> Puede ser un factor implicado en la estructuración de los cromosomas, y también un factor de regulación de la actividad postranscripcional de los genes ligados a la proliferación celular, no como iniciador sino como regulador.<sup>116</sup> El gen que codifica el Ki-67 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 10(10q25).<sup>113,118</sup>

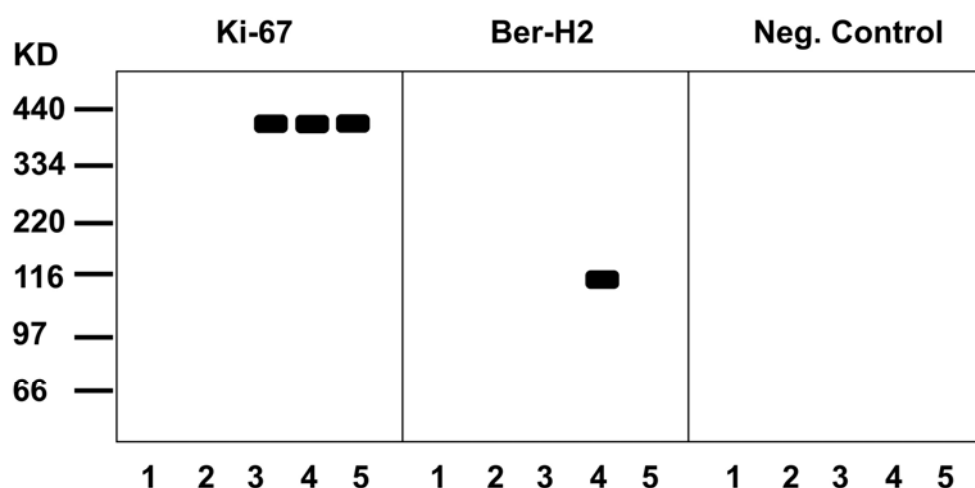


FIGURA 10. PROTEINA Ki-67. IMAGEN DEL ARTICULO ORIGINAL PUBLICADO POR GERDES EN LA QUE SE IDENTIFICA EL Ki-67 COMO UNA DOBLE BANDA DE PESO MOLECULAR 345 Y 395 KD, EN LAS TIRAS DE ELECTROFORESIS 3, 4 Y 5 CORRESPONDIENTES A FRAGMENTOS DE CÉLULAS PROLIFERANTES.<sup>106</sup>

Cooper sugiere que actúa como un «reloj molecular».<sup>119</sup> Sin embargo, el Ki-67 no es esencial para la proliferación celular: Schonk ha referido proliferación en algunas células híbridas en ausencia de antígeno Ki-67;<sup>118</sup> y otros autores encuentran negatividad del Ki-67 en células incluidas en el ciclo,<sup>120,121,122,123</sup> detectado por citometría de flujo. Si bien otros autores no han constatado estos hechos.<sup>124</sup>

El Ki-67 es un antígeno nuclear, aunque ocasionalmente se ha encontrado reactividad del anticuerpo en el citoplasma. Ello puede ser debido a que exista asociación entre el antígeno Ki-67 y el RNA mensajero «latente»;<sup>125</sup> o bien a artefacto, asociado con la muerte celular.<sup>102,126</sup>

El antígeno Ki-67 se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular.<sup>127</sup> Se empieza a detectar en la fase G1 del ciclo celular, aumentando durante el ciclo, y alcanza su máxima expresión en la fase de postsíntesis -G2-, descendiendo rápidamente después de la mitosis. No es evidente en células que pasan del estado de reposo G0 a G1 -G1 inicial-.<sup>128,129,130</sup>

Verheijen ha demostrado que el antígeno Ki-67 se localiza durante la interfase en el córtex nucleolar y en los componentes fibrilares densos;<sup>131</sup> lo que sugiere a Brown que el antígeno está asociado con la denominada matriz nuclear de filamentos intermedios.<sup>132</sup>

El Ki-67 presenta una localización exclusivamente nuclear, existiendo variaciones de intensidad durante el ciclo.<sup>116,107,133</sup> Así, de la fase G1 a la fase de mitosis puede incrementarse dos veces,<sup>119</sup> tres veces,<sup>116</sup> o seis veces,<sup>110</sup> según cuantificaciones de diferentes autores. Este aumento es máximo al final de la fase S para unos,<sup>134</sup> y entre la fase G2 y la mitosis para otros.<sup>113,107</sup> Al principio de la fase G1 existe una bajada en la intensidad de tinción para el Ki-67, que decrece repentinamente para comenzar el ascenso progresivo hasta la mitosis; este pico inferior indica el comienzo de la síntesis del Ki-67.<sup>135</sup>

El cambio a lo largo del ciclo celular para la tinción del Ki-67 no es sólo cuantitativo, sino también en cuanto a repartición topográfica dentro del núcleo celular.<sup>102,103,110,121</sup> Así durante la fase G1 la tinción primero es nucleoplásmica, y luego pasa rápidamente a ser nucleolar y perinucleolar, en la fase S se extiende al nucleoplasma, siendo aún todavía más evidente en el nucléolo; en la fase G2 se reparte más o menos uniformemente por todo el núcleo, y entonces la predominancia nucleolar ya no es perceptible.

Durante la mitosis se produce una tinción intensa en la profase, localizándose en la periferia de los cromosomas durante la metafase.<sup>109,110,136</sup> Tanto en anafase como en telofase la tinción sufre una redistribución topográfica, haciéndose granular y desapareciendo al final de la telofase.<sup>103,109</sup>

Desde su aparición, han sido numerosos los trabajos que se refieren a este antígeno. El mayor obstáculo para aplicar su detección radicaba en que el anticuerpo Ki-67 detectaba la actividad nuclear en tejidos frescos y en cortes en congelación.

En el año 1990 se publicaron la clonación y secuencia del gen Ki-67 (FIGURA 10 y FIGURA 11) y subsecuentemente surgió un nuevo anticuerpo monoclonal:<sup>101</sup> «MIB-1»,<sup>137</sup> que reacciona con el Ki-67 nativo y su proteína recombinante, y a diferencia del anticuerpo Ki-67 puede ser utilizado en tejidos fijados y parafinados.<sup>99,123,138,139</sup> El anticuerpo MIB-1 es un péptido sintetizado de una región de 62 pares de bases del gen Ki-67; y esta región presumiblemente encoda con el epítipo del Ki-67;<sup>115</sup> aunque utilizado por otros autores suponen que marca probablemente epítopes distintos al homólogo usado para material congelado.<sup>99</sup>

## FRAGMENTO DEL GEN Ki-67

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| TTCTTAGCAC        | TCAGGAAACT        | AACACCATCA        | GCAGGGAAAG        | CCATGCTTAC        | GCCCAAACCA        | 60   |
| GCAGGACGTG        | ATCAGAAAGA        | CATTAAAGCA        | TTTATGGGAA        | CTCCAGTGCA        | GAAACTGAC         | 120  |
| CTGGCAGGAA        | CTTTACCTGG        | CACCAAAAGA        | CACCTACAGA        | <u>CTCCTAAGGA</u> | <u>AAACCCCAG</u>  | 180  |
| <u>CCGCTACAAG</u> | <u>ACCTGGCTGG</u> | <u>CTTTAAAGAG</u> | <u>CTCTTCCAGA</u> | CTCCTAAGGA        | CACCGAGGAA        | 240  |
| TTAGTGGCTC        | CTGGTAAAC         | CACTAAATA         | CCCTGCGACT        | CTCCACAGTC        | AGACCCAGTG        | 300  |
| GACACCCCAA        | CAACCACAAA        | GCAACGACCC        | AACAGAACTA        | TCAGGAAAGC        | ACATGTAGAC        | 360  |
| GGAGAACTCT        | TAGCGTGCAG        | GAATCTAATG        | CCATCAGCAG        | GCAAAGCCAT        | GCACACGCCT        | 420  |
| AAACCATCAG        | TAGGTGAAGA        | GAAAGACATC        | ATCATATTTG        | TGGGAACTCC        | AGTGCAGAAA        | 480  |
| CTGGACCTCA        | CAGAGAACTT        | AACCCCCACC        | AAGAGACCCG        | <u>CACAAACTCC</u> | <u>TAACGAAGAG</u> | 540  |
| <u>GCCACGCTC</u>  | <u>TGGAAGACCT</u> | <u>GACTGGCTTT</u> | <u>AAAGAGCTCT</u> | <u>TCCAGACCCC</u> | TCGTCATACT        | 600  |
| GAAGAAGCAG        | TGCCTGCTGG        | CAAAACTACT        | AAAATGCCCT        | GCGAATCTTC        | TCCACCAGAA        | 660  |
| TCAGCAGACA        | CCCCAACAAG        | CACAAGAAGG        | CAGCCCAAGA        | CACCTTTGCA        | GAAAAGGGAC        | 720  |
| CTACAGAACG        | AGCTCTCAGC        | CCTGAAGAAG        | CTCACACAGA        | CATCAGGGGA        | AACCACACAC        | 780  |
| ACAGATAAAG        | TACCAGCACC        | TGACCATAAA        | AGCATCAACG        | CGTTTACCGA        | AACTGC AAAA       | 840  |
| CAGAAACTCG        | ACCCAGCAGC        | AAGTGTAACT        | GGTAGCAAGA        | GGCACC CAAA       | AACTAAGGAA        | 900  |
| AAGGCCCAAC        | <u>CTCTAGAAGA</u> | <u>CCTGGCTGGC</u> | <u>TGGAAGAGC</u>  | <u>TCTTCCAGAC</u> | ACCAGTATGC        | 960  |
| ACTGACAAGC        | CCACGACTCA        | CGAGAAAAC         | ACCAAAATAG        | CCTCCAGATC        | ACAACCAGAC        | 1020 |
| CCAGTGGACA        | CACCAACAAG        | CTCCAAGCCA        | CAGTCCAAGA        | GAAGTCTCAG        | GAAAGTGGAC        | 1080 |
| GTAGAAGAAC        | AATTC             |                   |                   |                   |                   |      |

FIGURA 11. FRAGMENTO DEL GEN Ki-67. FRAGMENTO DE 1095-BP DEL GEN Ki-67, QUE CONTIENE SECUENCIAS REPETITIVAS DE 300-BP, EN LAS QUE SE IDENTIFICA UNA SECUENCIA DE 62-BP DE FORMA REPETITIVA CON ALTOS NIVELES DE HOMOLOGÍA -EN SUBRAYADO-. ESTA SECUENCIA, O PARTE DE ELLA, ENCODA PARA EL EPITOPO QUE ES DETECTADO POR EL AC-Ki-67 -MODIFICADO DE GERDES-

,115

Frente a otros marcadores de proliferación celular utilizados, el MIB-1 ofrece ventajas: respecto al antígeno de células de proliferación nuclear (PCNA), porque el Ki-67 no sufre modificaciones cuando existe escisión-reparación del DNA,<sup>99,140</sup> ni parece estar influenciada por factores de crecimiento, como posiblemente lo esté la PCNA.<sup>141</sup> En general, la técnica del MIB-1 es menos compleja y más accesible que la realización de citometrías de flujo y estática, o que el recuento numérico de AgNORs, y que el índice de marcaje con bromodeoxyuridina (BUDR).<sup>142,143</sup>

Además, la vida media de la proteína Ki-67 es muy corta,<sup>113</sup> catabolizándose rápidamente al final de la mitosis, -fase M-,<sup>113,144</sup> con la consiguiente rápida disminución de su concentración nuclear; <sup>94,95,102,113</sup> por lo que sólo se detectará marcaje en células dentro del ciclo celular,<sup>92,94,95,145</sup> contrariamente a lo que sucede con la PCNA, que debido a su vida media larga,<sup>146</sup> puede aún ser detectada en células que ya han terminado el ciclo.<sup>95</sup>

Una característica general de los tumores sólidos es la alta asociación entre la actividad proliferativa y el grado de agresividad tumoral.<sup>147</sup> La utilización del anticuerpo MIB-1, para la detección del antígeno Ki-67 en cortes en parafina, nos permite realizar estudios retrospectivos del material archivado, dado que es creciente la evidencia de que el contenido del Ki-67 se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad, en diversos tipos de tumores.<sup>148,149,150,151,152</sup>

En el campo de determinados tumores, recientes trabajos han encontrado relación entre la expresión del Ki-67 -índice proliferativo-, y la supervivencia; pudiendo ser utilizado el índice de expresión del Ki-67 como un indicador pronóstico.<sup>153,154,155,156,157,158</sup>

Es más dudosa su relación con el grado histológico; observándose diferencias en la expresión del Ki-67 entre los grupos de Alto y Bajo Grado, pero no entre los dos tipos tumorales de Alto Grado (Grados III y IV), hecho que ha sido puesto de manifiesto por diversos autores;<sup>124,159,160,141,161,162,163</sup> contrariamente a lo referido en otros estudios.<sup>140,142,164,165</sup> Tampoco se ha encontrado correlación entre el índice de MIB-1 -expresión del Ki-67- y la proliferación microvascular.<sup>166</sup>

Por otra parte, es también conocida la heterogeneidad en la actividad proliferativa tumoral, con áreas de más o menos actividad, con la consiguiente variabilidad zonal en la expresión del Ki-67.<sup>118,145,167,168,169</sup> Brown,<sup>132</sup> basándose en el trabajo de Verheijen en el que demuestra la pérdida del antígeno Ki-67 en células privadas de nutrición, responsabiliza a los factores nutricionales de la variabilidad de expresión observada.<sup>123</sup>

Para valorar la actividad proliferativa tumoral se han desarrollado métodos de conteo celular, expresando la relación entre células en mitosis y células fuera del ciclo celular mediante un índice de proliferación «IP»: valor de «Ki-67IP», en porcentaje, de manera cuantitativa y otras veces por patrón.<sup>95,141,144,155</sup>

---

## RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA TERAPIA FOTODINAMICA Y p53/Ki-67

---

La proteína p53 es un marcador de severidad en el daño solar.

Implica pérdida de la función barrera resultando en una mayor conversión de MAL a protoporfirina en la piel lo que conduce a un fuerte efecto de la TFD.

Las QA son una enfermedad de campo, no limitada a las lesiones, por lo que se han descrito mutaciones en el p53 y alteraciones en el DNA mitocondrial hasta de 7cm alrededor de CE. Se sabe que el riesgo de progresión de las QA a CE está entre el 1,5 y el 15%.<sup>170</sup>

Trabajos realizados utilizando otros tipos de fuentes de luz como laser ablativos en estudios de rejuvenecimiento encuentran eliminación casi total de la inmunotinción p53 en un periodo de 6 meses. Ayuda o proporciona una justificación de usar la positividad del p53 como un marcador de daño solar residual después de una intervención terapéutica.

En estudios como el de Orringer no se modifica el p53 con 5-ALA al mes de tratamiento.<sup>171</sup>



El p53 es una proteína nuclear considerada el guardián del genoma. Su función principal es prevenir la oncogénesis mediante la inducción de la apoptosis o detención del ciclo celular cuando existe una agresión externa que pueda causar daños en el DNA. Se encuentra mutado en el 50% de los tumores malignos.

Aparece sobre expresado en la piel expuesta al sol probablemente debido a los rayos UV, por lo que se considera un marcador de exposición al sol de los últimos 6 meses. El p53 es positiva en el 50% de las QA, siendo baja su expresión.

La proteína Ki-67 es una proteína localizada en el núcleo con un papel fundamental en la proliferación celular de los queratinocitos.

Orringer encuentra un aumento de más de 5 veces en su expresión después del tratamiento con TFD y 5-ALA.<sup>171</sup>

---

#### COLAGENO IV

---

El colágeno es el componente estructural más importante de la dermis, representando el 75% del peso seco de la piel, proporciona resistencia a la tracción y a la elasticidad –le da fuerza de tensión-.<sup>172</sup>

Están producidas por los fibrocitos y se agrupan en gruesas bandas onduladas que, en dermis media y profunda se disponen paralelas a la superficie cutánea, mientras que en dermis papilar son verticales.<sup>173</sup>

El colágeno de tipo IV, se encuentra por toda la dermis asociado con fibrillas y espacios interfibrilares, contribuyendo a la organización de la matriz y relacionado con la membrana basal.<sup>174</sup>



## HIPOTESIS

---

## HIPOTESIS

---

La TFD produce modificaciones en los componentes cutáneos, estas alteraciones podrían ser beneficiosas en los pacientes corrigiendo la estructura histológica cutánea.

## OBJETIVOS

---

## OBJETIVOS

---

En el desarrollo de esta tesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Valorar las características clínicas histológicas, y de factores celulares proteínicos en pacientes antes del tratamiento.
- 2) Valorar las características clínicas histológicas, y de factores celulares proteínicos en pacientes después del tratamiento.
- 3) Valorar las diferencias que se puedan producir.

## SUJETOS Y MÉTODOS

---

## SUJETOS Y MÉTODOS

---

---

### DISEÑO

---

Estudio prospectivo, longitudinal.

---

### POBLACIÓN A ESTUDIO

---

Los pacientes incluidos en el estudio son aquellos que se reciben en las consultas del Servicio de Dermatología y Venereología del Hospital central de la defensa “Gómez Ulla” (HCDGU). Entre ellos se encuentran aquellos pertenecientes a ISFAS (Instituto social de las Fuerzas Armadas), organismo encargado de gestionar el régimen especial de la seguridad social de las Fuerzas Armadas y de la Guardia Civil y ciudadanos del SERMAS (Servicio madrileño de Salud) del área 11 de la comunidad autónoma de Madrid, -Según la Resolución 87/2007 del 4 de julio de 2007 con el Convenio de colaboración entre el Ministerio de Defensa y la comunidad de Madrid-. Los pacientes son residentes en dicha comunidad autónoma. La cumplimentación de los datos en el cuaderno de recogida de datos (CRD) se ha realizado por un solo investigador a fin de preservar la uniformidad y homogeneidad de los datos anotados (ANEXOS).

---

### TAMAÑO MUESTRAL

---

Según la bibliografía consultada de trabajos anteriores similares, <sup>175,176,177,178,179,180</sup> se seleccionaron 37 pacientes, de los cuales solo terminaron el estudio 35. Todos fueron mayores de 60 años de edad, varones, que presentaban a nivel de cuero cabelludo múltiples QA -campo de cancerización-, de fototipo bajo y sin tratamiento en los 6 meses previos del mismo, entre setiembre de 2010 a febrero de 2011.

---

### MUESTREO

---

Consecutivo no probabilístico.

---

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

---

Se han incluido en este estudio, todos los pacientes diagnosticados de QA en cuero cabelludo por el Servicio de Dermatología del HCDGU y que son susceptibles de

tratamiento con TFD según el algoritmo ya planteado (FIGURA 5). Además se pidió por escrito el consentimiento del paciente para ser incluido en la base de datos para la realización del estudio, con autorización del CEIC (Comité de ética e investigación clínica) del Hospital –ver página 7-.

---

### CRITERIOS EXCLUSIÓN

---

Se excluyeron del estudio, aquellos pacientes que tuvieran algún tipo de demencia o enfermedad psiquiátrica grave, considerándose que no podría obtenerse toda la información necesaria sobre la historia y antecedentes requeridos para el estudio; así como pacientes que toman medicación con potencial fototóxico, con otras dermatosis del cuero cabelludo, con diagnóstico de porfirias y xeroderma pigmentoso (XP). Hipersensibilidad al Aminolevulinato de metilo clorhidrato y al cacahuete. No se incluyeron tampoco aquellos pacientes que no hubieran firmado el consentimiento informado.

---

### ASPECTOS ÉTICOS

---

El presente estudio se adhiere a las recomendaciones de la declaración de Helsinki sobre aspectos éticos en la investigación biomédica. La justificación ética del estudio está basada en la gran importancia de la patología a investigar. Todos los sujetos participantes fueron informados en presencia de un testigo y la información recogida tiene carácter confidencial y transmitida y almacenada según lo dictado en la ley orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de protección de datos. Los CRD se identificaron por un código compuesto por cinco caracteres, tres letras -iniciales de nombre, primer y segundo apellido seguido de dos números-. En ningún documento del estudio aparecen datos que permitan la identificación de los sujetos en estudio. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

---

### VARIABLES A ESTUDIO

---

Independientes: Tratamiento con TFD –dicotómica-, antes y después.

DEPENDIENTES:

- a) Grosor de la epidermis -cuantitativa continua- en  $\mu\text{m}$ .

- b) Grosor de la dermis -cuantitativa continua- en  $\mu\text{m}$ .
- c) Cantidad de infiltrado inflamatorio -politémica de 4 categorías- en ausente, bajo, medio y alto.
- d) P53 -politémica de 4 categorías- en: ausente, bajo, medio y alto.
- e) Ki-67 -politémica de 4 categorías- en: ausente, bajo, medio y alto.
- f) Colágeno IV -cuantitativa continua- en  $\mu\text{m}$ .

#### CONTROL:

- a) Edad -cuantitativa discreta-.
- b) Fototipo -politémica de 7 categorías- según la clasificación de Fitzpatrick en: 0, I, II, III, IV, V y VI (FIGURA 12).

| FOTOTIPO | COLOR PELO    | COLOR PIEL | QUEMADURA   | BRONCEADO  |
|----------|---------------|------------|-------------|------------|
| 0        | BLANCO        | BLANCO     | SIEMPRE     | NUNCA      |
| I        | PELIRROJO     | LECHOSO    | SIEMPRE     | NUNCA      |
| II       | RUBIO         | CLARO      | FRECUENTE   | MUY LIGERO |
| III      | RUBIO-MARRÓN  | CLARO      | FRECUENTE   | SUAVE      |
| IV       | MARRÓN OSCURO | OSCURO     | RARA VEZ    | OSCURO     |
| V        | MARRÓN OSCURO | OSCURO     | EXCEPCIONAL | OSCURO     |
| VI       | NEGRO         | NEGRO      | NUNCA       | MUY OSCURO |

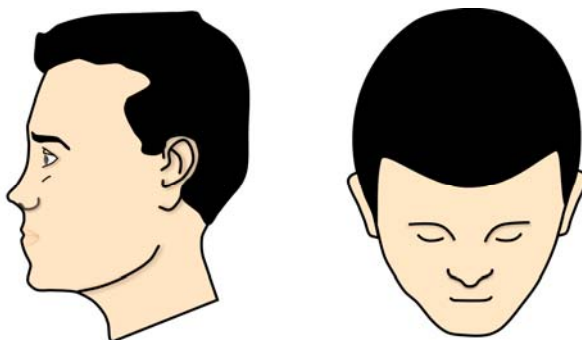
FIGURA 12. CLASIFICACIÓN DE FITZPATRICK DE LOS FOTOTIPOS. MODIFICADO DE CONEJO-MIR.<sup>181</sup>

- c) Intensidad -politémica de 4 categorías- en: ausente -QA no se ven ni se palpan-, ligera -QA palpables pero no visibles-, moderada -QA visibles- e intensa -QA visibles e hiperqueratósicas-.

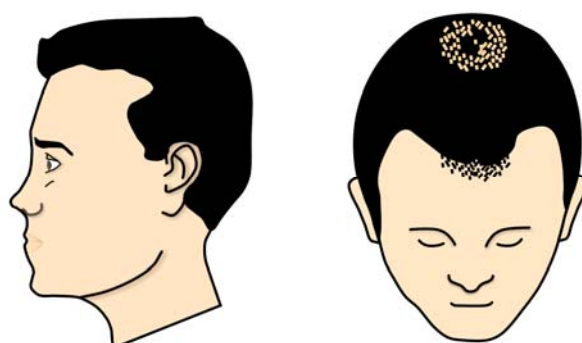


- d) Calvicie -politómica de 5 categorías- en grados del: I, II, III, IV y V (FIGURA 13).

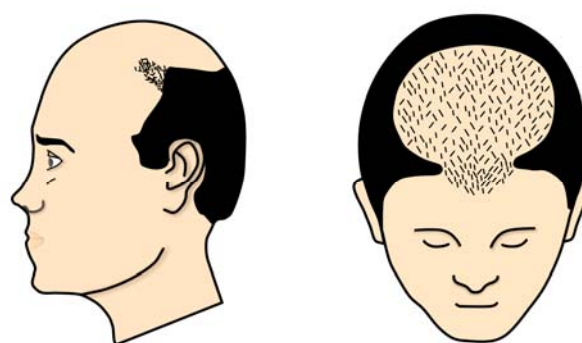
Tipo I



Tipo II



Tipo III



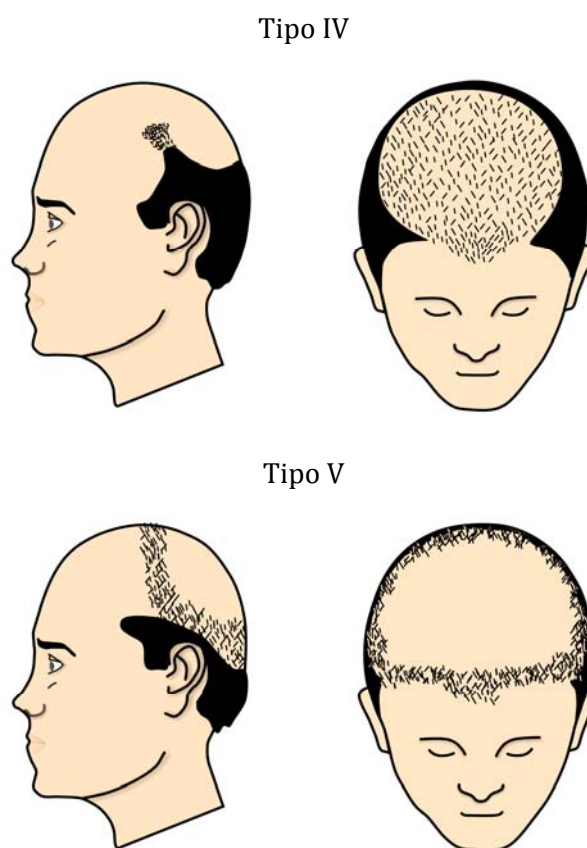


FIGURA 13. ESCALA DE EBLING DEL I AL V, PATRONES DE PÉRDIDA DE PELO EN LOS HOMBRES. MOD DE VILATA CORELL.<sup>182</sup>

- e) Fotoenvejecimiento -politémica de 4 categorías- según la escala de Glogau en: I, II, III y IV (FIGURA 14).

| TIPO I. NO ARRUGAS   |
|--|
| FOTOENVEJECIMIENTO INCIPIENTE.   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• CAMBIOS PIGMENTARIOS LEVES.</li> </ul>                |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• NO QUERATOSIS.</li> </ul>                             |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• MÍNIMAS ARRUGAS.</li> </ul>                           |
| PACIENTE JOVEN, 20 A 35 AÑOS.  |
| MÍNIMO O SIN MAQUILLAJE.   |
| TIPO II. ARRUGAS DE EXPRESIÓN  |
| FOTOENVEJECIMIENTO MODERADO.   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• LENTIGOS SENILES INCIPIENTES.</li> </ul>              |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• QUERATOSIS PALPABLES PERO NO VISIBLES.</li> </ul>     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• LÍNEAS PARALELAS DE LA SONRISA INCIPIENTE.</li> </ul> |
| EDAD DEL PACIENTE 35 A 50 AÑOS.  |
| GENERALMENTE LLEVA ALGO DE MAQUILLAJE.   |
| TIPO III. ARRUGAS EN RELAX   |
| FOTOENVEJECIMIENTO AVANZADO.   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• DISCROMÍA Y TELANGIECTASIAS.</li> </ul>               |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• QUERATOSIS VISIBLES.</li> </ul>                       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• ARRUGAS INCLUSO SIN GESTOS.</li> </ul>                |
| EDAD DEL PACIENTE 50 A 60 AÑOS.  |
| SIEMPRE LLEVA MAQUILLAJE ESPESO.   |
| TIPO IV. SOLO ARRUGAS  |
| FOTOENVEJECIMIENTO INTENSO.  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• COLOR DE LA PIEL AMARILLO-GRIS.</li> </ul>            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• PRECÁNCER CUTÁNEO.</li> </ul>                         |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• ARRUGAS GENERALIZADAS, NO PIEL NORMAL.</li> </ul>     |
| EDAD DEL PACIENTE 60 A 80 AÑOS.  |
| NO PUEDE LLEVAR MAQUILLAJE.  |

FIGURA 14. CLASIFICACIÓN DEL FOTOENVEJECIMIENTO DE GLOGAU. MODIFICADO DE CONEJO-MIR.<sup>181</sup>

- f) Antecedentes dermatológicos -politémica de 8 categorías- en: ninguno, antecedentes patológicos (AP) de riesgo -quemaduras, exposición solar prolongada, UVA, pecas, calvicie-, QA, CB, CE, melanoma (ME), queratosis seborreica (QS), psoriasis (PS), varios.
- g) Efectos secundarios -politémica de 6 categorías- en: eritema, eritema mas descamación, descamación, edema, ulceración y varios.
- h) Grado de satisfacción -politémica de 10 categorías-: del 1 malo al 10 excelente.
- i) Resultados estéticos -politémica de 3 categorías- en: ninguno -QA que no desaparecen-, bueno -persistencia de una o dos QA- y muy bueno -QA que no se ven ni se palpan-.
- j) Número de años que lleva acudiendo a consultas -cuantitativa discreta-.
- k) Número de consultas realizadas -cuantitativa discreta-.
- l) Tratamientos anteriores -politémica de 5 categorías- en: nada, crioterapia, imiquimod, crioterapia más imiquimod y cirugía.
- m) Medicación habitual -dicotómica-, se consideró como paciente polimedicado si toma más de 3 medicamentos.

## MATERIAL

---

Equipo para realizar TFD: lámpara Aktilite® CL 128 fuente de luz roja -635 nm- ASA PhotoCure (FIGURA 15).



FIGURA 15. LAMPARA AKTILITE® CL128.

Crema: Metvix® 160 mg/g, principio activo MAL (FIGURA 16).



FIGURA 16. METVIX® CREMA 160mg/g TUBO DE 2 g.

Microscopio: Nikon® Eclipse ME-600 equipado con sistema digital de imagen DS-5M-L1 -Tokyo, Japón-(FIGURA 17).



FIGURA 17. SISTEMA DIGITAL DE IMAGEN DS-5M-L1 Y MICROSCOPIO NIKON® ECLIPSE ME-600.

Biopsia: punch de 4 mm.

Tinción: Las biopsias fueron fijadas en formol al 10 %, embebidas en parafina y seccionas en un grosor de 5  $\mu$ m y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de rutina.

Plantilla: de film transparente cuadriculada y numerada de forma consecutiva, con el anverso para la primera biopsia y el reverso para la segunda (FIGURA 18).

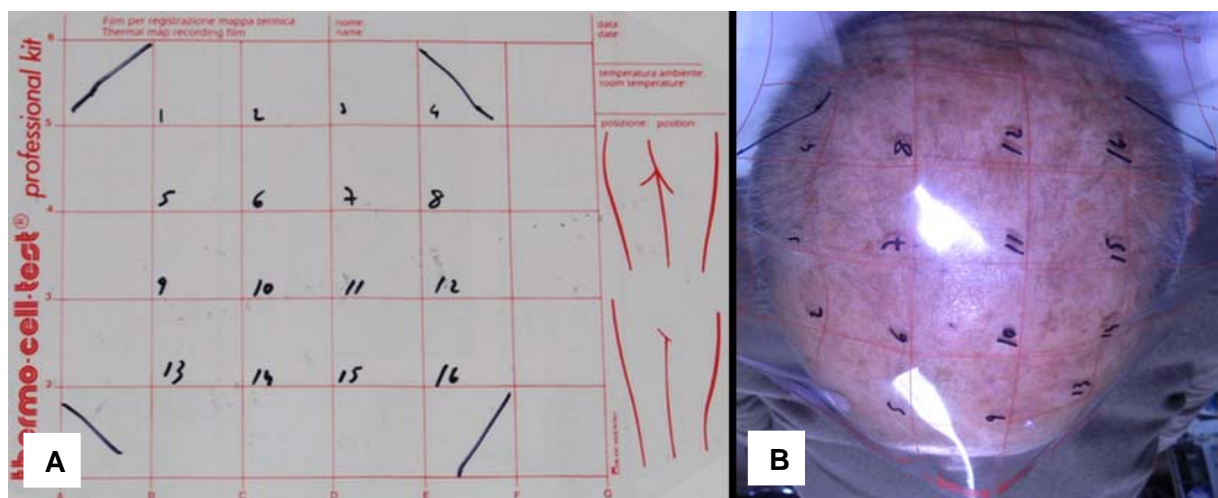


FIGURA 18. A, PLANTILLA DE FILM TRANSPARENTE NUMERADA PARA REALIZAR LAS BIOPSIAS AL AZAR. B, UBICACIÓN DE LA PLANTILLA.

## MÉTODOS

### MÉTODO DE BIOPSIA

Se realiza biopsia del cuero cabelludo en forma aleatoria al paciente que acude a la consulta, con independencia de la existencia de un grado evolutivo de QA en alguna de las áreas. Se utiliza la plantilla de film transparente cuadriculada y numerada en forma consecutiva utilizando el anverso para la primera biopsia y el reverso para la segunda.

### MÉTODO APLICACIÓN DE LA CREMA Y LUZ

Se realiza la TFD con Metvix® Crema 160 mg/g, aplicada sobre la zona, abarcando todo el cuero cabelludo durante 3 horas en cura oclusiva, transcurrido este tiempo se retira la crema y se expone la lesión a una fuente de luz roja -635 nm-, la lámpara Aktilite®, a una distancia de 8 cm, con una potencia de 37 J/cm<sup>2</sup>, que activa la crema. Siendo la intensidad puesta en su fabricación de forma estándar para el uso de la lámpara (FIGURA 19).



FIGURA 19. PROCEDIMIENTO PARA APLICAR LA CREMA EN EL CUERO CABELLUDO EN CURA OCLUSIVA. A, CURETAJE Y APLICACIÓN DE LA CREMA. B, PAPEL DE ALUMINIO. C, CAPELINA.

### MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE GROSORES DE EPIDERMIS Y DERMIS

Para coger las medidas se utilizó el software que trae incorporado el sistema digital de imagen DS-5M-L1 del Microscopio Nikon®.

El grosor de la epidermis se midió desde la lamina basal hasta la capa granulosa, excluyendo el estrato corneo; cogiendo tres medidas-correspondientes a los 3 cuartiles-, 2 laterales y una central, hallando posteriormente la media (FIGURA 20).



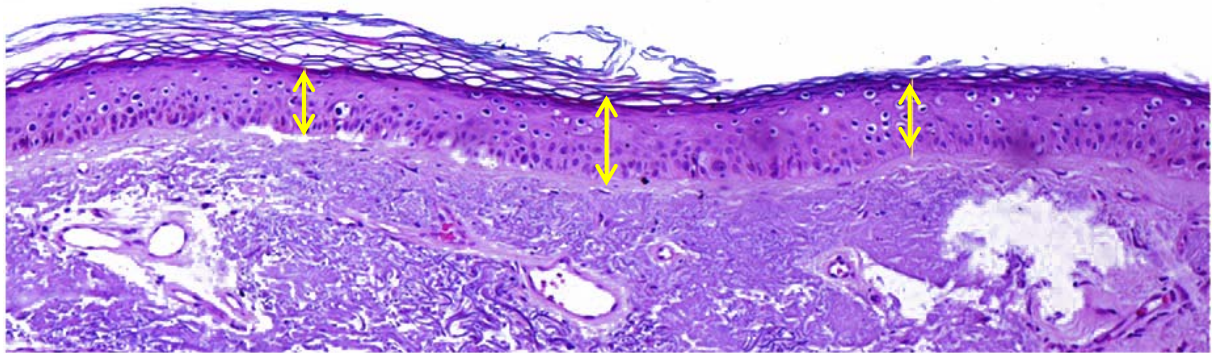


FIGURA 20. TOMA DE LAS MEDIDAS PARA HALLAR EL GROSOR DE LA EPIDERMIS. MICROSCOPÍA OPTICA, H&E (400X).

Para el grosor de la dermis se midió desde la lámina basal hasta el comienzo de los adipocitos, cogiendo tres medidas -correspondientes a los 3 cuartiles-, 2 laterales y una central, hallando posteriormente la media (FIGURA 21).

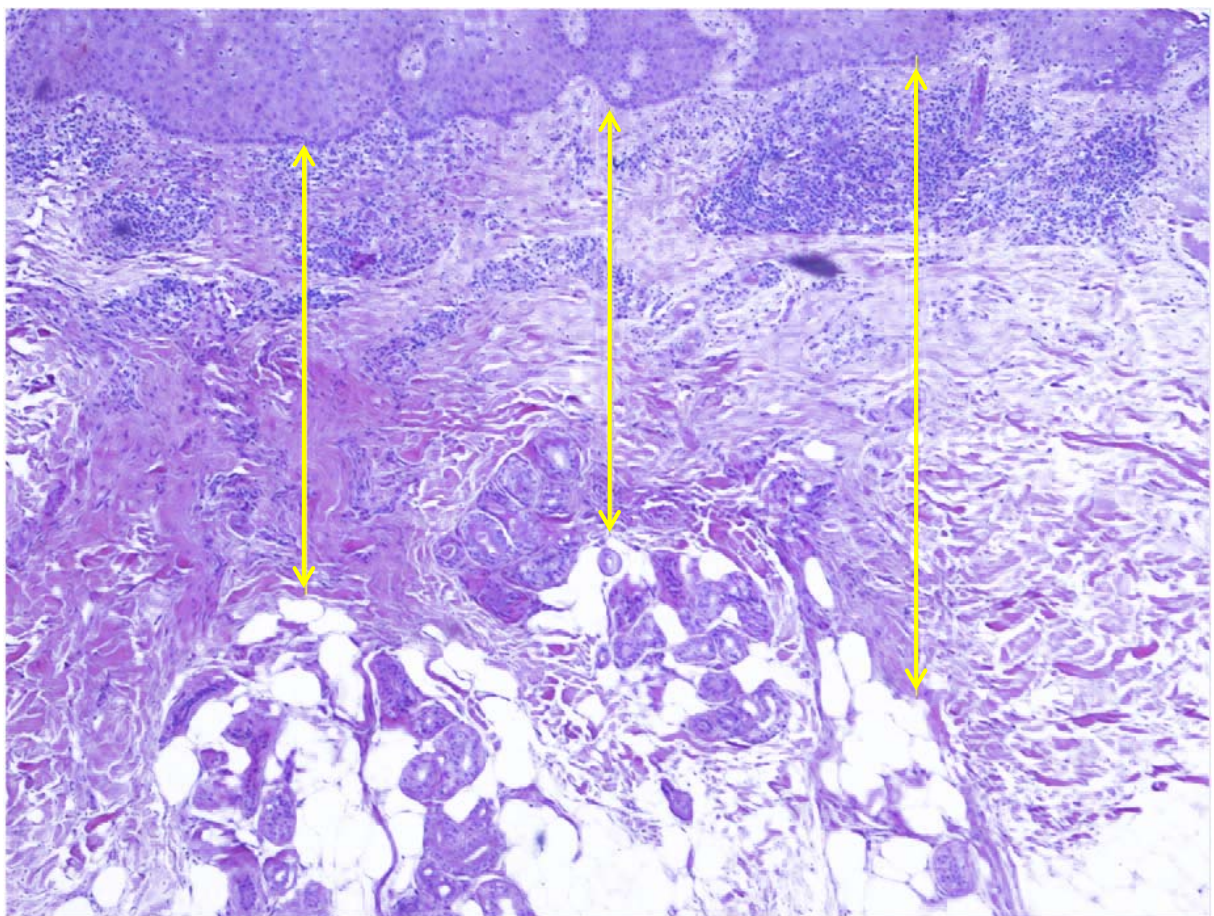


FIGURA 21. TOMA DE LAS MEDIDAS PARA CALCULAR EL GROSOR DE LA DERMIS. MICROSCOPÍA OPTICA, H&E (400X).



## MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE INFILTRADO INFLAMATORIO

Para el infiltrado inflamatorio se procedió según la cantidad de células inflamatorias medida en número/campo microscópico a 200x, clasificadas en: Nada (<5), bajo (>5 a <30), medio (>30 a <60) y alto (>60 células).

## METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

### ANTES

- Consentimiento informado
- Toma de biopsia en cuero cabelludo de piel clínicamente sana en una zona al azar con la plantilla, previa anestesia local con mepivacaína con vasoconstrictor, y posterior sutura con un punto utilizando Vicryl® de 3 ceros.
- Se debe aplicar vaselina salicilica al 10% durante 3 noches anteriores.
- Aportará el medicamento: Metvix®.
- Se le extiende tantas recetas como unidades de superficie se vayan a tratar -1 ud. de superficie = 1 palma de mano de la talla 7-.
- Se le cita a las 9:00 horas.
- Se le recibe por enfermera y/o auxiliar.
- Permanece en Botiquín 10 minutos con fomentos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para reblandecer las QA.
- Al término, las lesiones se frota con la gasa hasta desprenderlas y/o se curetean.
- Se extiende la crema Metvix® con un espesor aproximado de 1 mm.
- Se cubre el área con un vendaje oclusivo y opaco.

### DURANTE

- A las 3 horas de la aplicación del Metvix®, se retira la crema aplicada con suero fisiológico.
- Gafas oscuras.
- El médico comprueba los datos demográficos y clínicos del paciente, que figuran en la historia.

- Se comprueba la fluorescencia de las lesiones mediante luz de Wood.
- Se cumplimenta el CRD.
- Al paciente se le aplica las dosis:

Intensidad: 37 mW.

Dosis: 37 J.

Distancia: 8 cm.

- Se comprueba encendido automático de ventilación-refrigeración y activarlo si es necesario.
- Se pone en marcha el ventilador y/o se abanica al paciente si nota molestias.
- Opcionalmente se le puede rociar la zona con agua fría.
- El paciente acompañado por una enfermera y/o auxiliar durante la exposición a la luz. En su defecto puede acompañarle un familiar.

#### DESPUÉS

- Se retira la crema con suero fisiológico.
- Cuidados post-tratamiento: Crema con factor de protección 50 de la zona tratada durante 2 días.
- Se informa al paciente de la aparición de costras, que caerán a los 10-15 días.
- Se cita a los 3 meses para repetir el procedimiento.

#### FINALMENTE

- Al mes de la última sesión, se realiza toma de biopsia de la forma anteriormente descrita.

## METODO FOTOGRÁFICO

Se realizan 3 tomas fotográficas con la misma incidencia y fondo uniforme para evaluar el antes y después del tratamiento (FIGURA 22). Para tal efecto se utilizó la cámara digital Nikon® coolpix p90 de 12,1 megapíxeles con objetivo NIKKOR y zoom de 24 aumentos (FIGURA 23).



FIGURA 22. FOTOGRAFÍA DEL ÁREA DE FORMA ESTANDARIZADA. A, LATERAL IZQUIERDO. B, FRONTAL. C, LATERAL DERECHO.



FIGURA 23. CÁMARA DIGITAL NIKON® COOLPIX P90.

---

## ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

---

Las muestras histológicas se obtuvieron por punch de 4 mm.

De cada biopsia correspondiente a los casos seleccionados se eligieron las preparaciones teñidas con H&E.

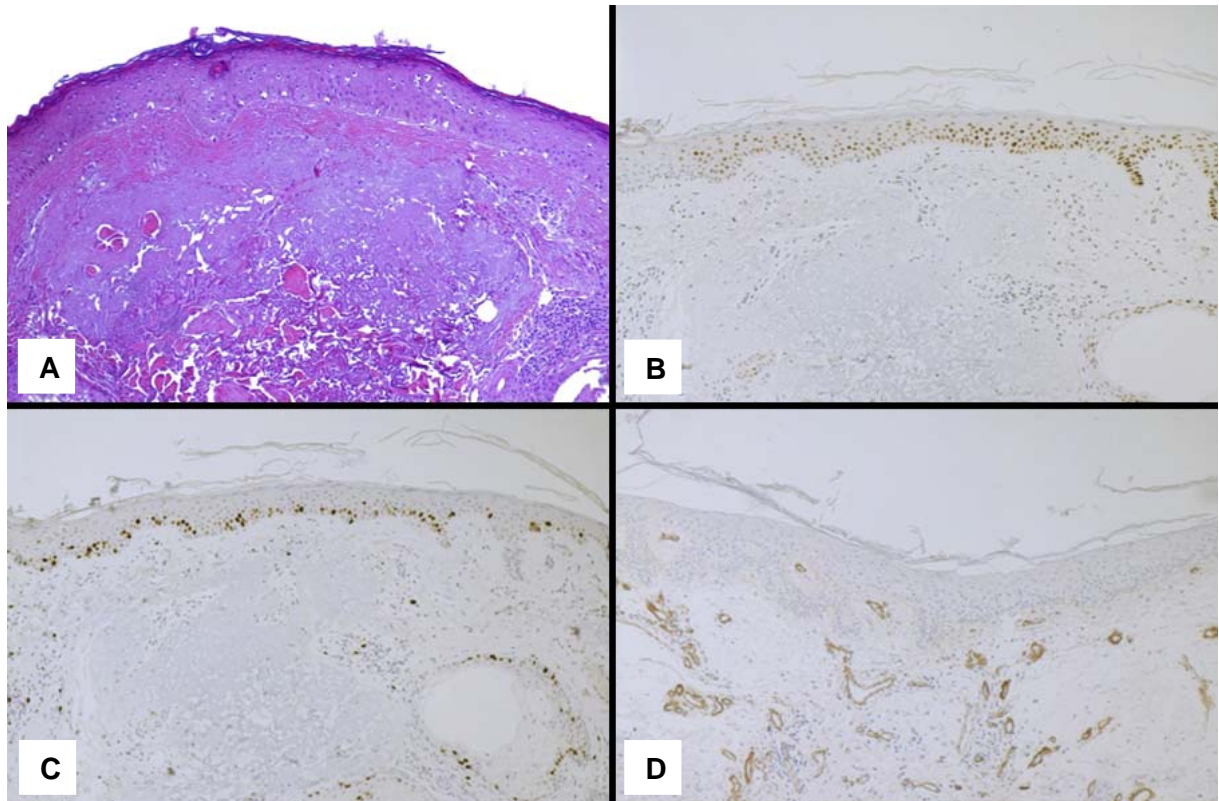


FIGURA 24. EJEMPLO DE TINCIONES UTILIZADAS. A, H&E. B, IHQ p53. C, IHQ Ki-67. D, COLAGENO IV. MICROSCOPIA OPTICA (100X DE AUMENTO).

---

## TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

---

En este estudio se ha aplicado el método indirecto con la utilización de polímeros de dextrano, en el que se dispone de un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno buscado, que actúa de diana para un anticuerpo secundario, que está unido a un polímero de dextrano con varias moléculas de peroxidada que en presencia de agua oxigenada, es capaz de oxidar la diaminobencidina, dando el característico color marrón de las zonas de unión del antígeno estudiado con el anticuerpo primario utilizado. Esta técnica consigue aumentar la sensibilidad de detección y hasta ocho veces con respecto a otras técnicas.

Como controles positivos se utilizaron tejidos con reactividad positiva conocida frente a cada anticuerpo. Como controles negativos se realizaron incubaciones con solución tampón en lugar de anticuerpo primario.

## ANTICUERPOS UTILIZADOS

### ANTICUERPOS PRIMARIOS

Los anticuerpos primarios se enumeran en la siguiente tabla:

TABLA 1. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LAS TINCIONES DE IHQ, PROCEDENCIA Y CARACTERÍSTICAS.

| ANTICUERPO  | CLON      | CASA COMERCIAL   | CONCENTRACIÓN |
|-------------|-----------|------------------|---------------|
| p53         | D07       | DAKO®            | 0,015 MOL/L   |
| Ki-67       | MIB-1     | DAKO®            | 0,015 MOL/L   |
| COLÁGENO IV | CIV 22(2) | DAKO CYTOMATION® | 50 MMOL/L     |

### ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Kit Dako Envision®.

### TECNICA DE IHQ

La técnica utilizada para la realización del estudio de IHQ fue la siguiente:

- 1) De los bloques de parafina previamente seleccionados se realizaron cortes mediante microtomo de 4–5 micras de grosor utilizando cristales tratados con polilisina.
- 2) Los cortes fueron desparafinados por dos pases por xilol durante 10 minutos cada uno.
- 3) Los cortes desparafinados se pasaron por alcohol absoluto durante 1 minuto.
- 4) Inhibición de la peroxidada endógena mediante el baño en una solución de 100 ml de metanol con 1 ml de agua oxigenada de 110 volúmenes, durante 20 minutos.
- 5) Rehidratación mediante baños sucesivos de alcohol de concentración progresivamente decreciente hasta el agua, según el siguiente método:

- Dos pases por alcohol de 96° de 1 minuto cada uno.
  - Dos pases por alcohol de 70° de 1 minuto cada uno.
  - Dos pases por tampón fosfato salino(PBS).
- 6) Con el fin de mejorar la exposición antigénica del tejido, se introducen las muestras en buffer citrato, previamente precalentado. Se calienta, y una vez que se alcanza el punto de ebullición se lleva al mínimo y se mantiene durante 3 minutos. Tras este proceso se realiza la apertura de la olla una vez que ha expulsado el vapor y la válvula queda en su posición inicial. Las preparaciones se dejan enfriar lentamente.
  - 7) Incubación con el anticuerpo primario, con las diluciones previamente descritas.
  - 8) Dos lavados de las muestras con PBS para retirar el exceso de anticuerpo primario.
  - 9) Incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente.
  - 10) Dos lavados de las muestras con PBS, para retirar el exceso de anticuerpo secundario.
  - 11) Se añade a las muestras la diaminobencidina a la que previamente se le ha añadido agua oxigenada, según se ha explicado previamente y se dejan incubar durante 5 minutos. La diaminobencidina forma un precipitado insoluble, de color marrón, en el lugar de fijación del anticuerpo secundario con el primario, en presencia de agua oxigenada.
  - 12) Lavar con abundante agua destilada el exceso de diaminobencidina.

## VALORACIÓN DE LAS PREPARACIONES

Las preparaciones fueron evaluadas por dos patólogos utilizando un microscopio óptico de doble visor, sin tener en cuenta el resto de las variables.

TABLA 2. VALORACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.

| VALOR/INTENSIDAD | p53                            | Ki-67   |
|------------------|--------------------------------|---|
| PATRÓN           | PARCHEADO/CLUSTERS             | MITAD INFERIOR DE LA DERMIS                   |
| AUSENTE          | AUSENCIA DE INMUNORREACTIVIDAD | AUSENCIA DE INMUNORREACTIVIDAD                |
| BAJO             | >0 A <30% DE NUCLEOS POSITIVOS | >0 A <30% DE NUCLEOS EN ZONA BASAL POSITIVOS. |
| MEDIO            | 30-60% DE NUCLEOS POSITIVOS    | 30-60% DE NUCLEOS EN ZONA BASAL POSITIVOS.    |
| ALTO             | >60-100% DE NUCLEOS POSITIVOS  | >60-100% DE NUCLEOS EN ZONA BASAL POSITIVOS.  |



Se consideraron positivas las muestras con tinción nuclear y la valoración fue cuantitativa. En el análisis estadístico se agruparon en:

Negativa: ausencia de tinción en las células normales.

Positiva con baja expresión: tinción nuclear de menos del 30% de los núcleos de las células de la epidermis.

Positiva con moderada expresión: tinción nuclear entre 30% y 60% de los núcleos de las células de la epidermis.

Positiva con alta expresión: tinción nuclear de más del 60% de los núcleos de las células de la epidermis (TABLA 2 y FIGURA 25).

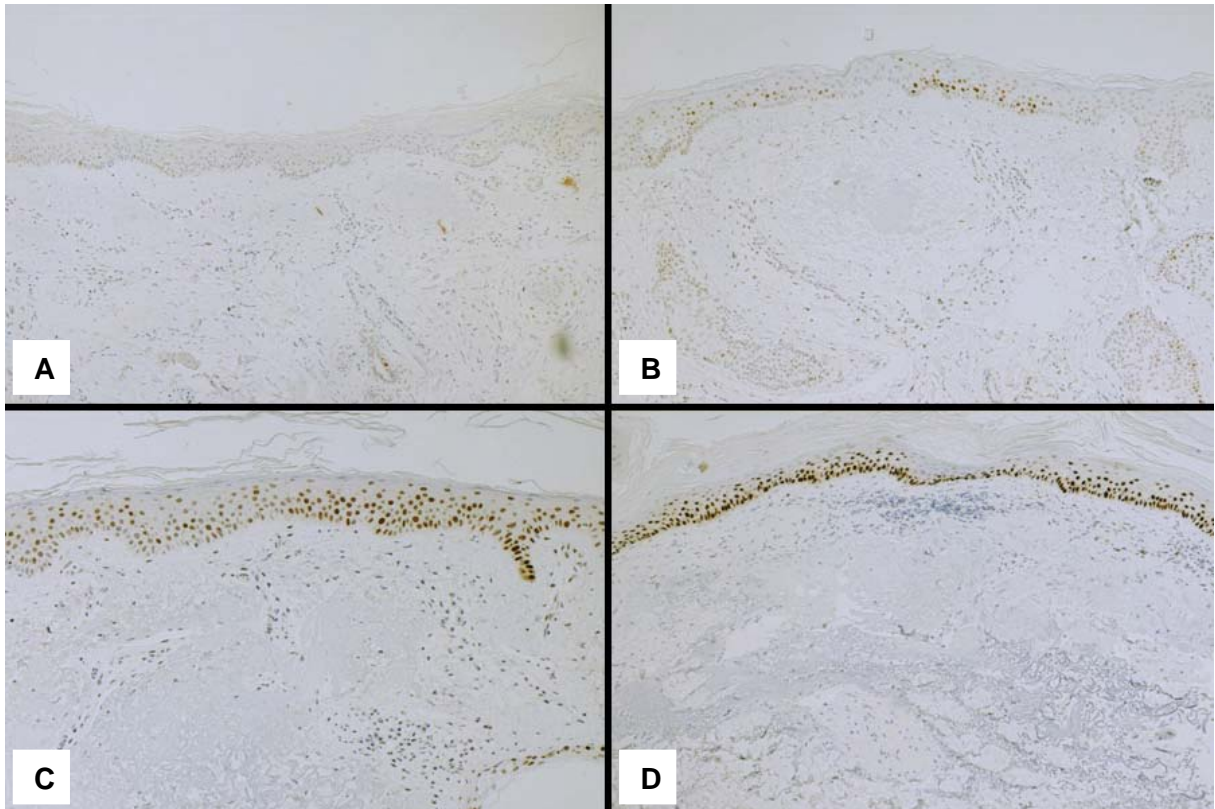


FIGURA 25. TIPOS DIFERENTES DE EXPRESIÓN ENCONTRADOS CON LA TINCIÓN IHQ PARA p53. A, AUSENTE. B, BAJO. C, MEDIO. D, ALTO. MICROSCOPIA OPTICA (100X DE AUMENTO).



---

**Ki-67**

---

Se consideraron positivas las muestras con tinción nuclear y la valoración fue cuantitativa:

Negativa: ausencia de tinción.

Positiva con baja expresión: tinción nuclear de menos del 30% de los núcleos de las células de la epidermis.

Positiva con moderada expresión: tinción nuclear entre 30% y 60% de los núcleos de las células de la epidermis.

Positiva con alta expresión: tinción nuclear de más del 60% de los núcleos de las células de la epidermis (TABLA 2 y FIGURA 26).

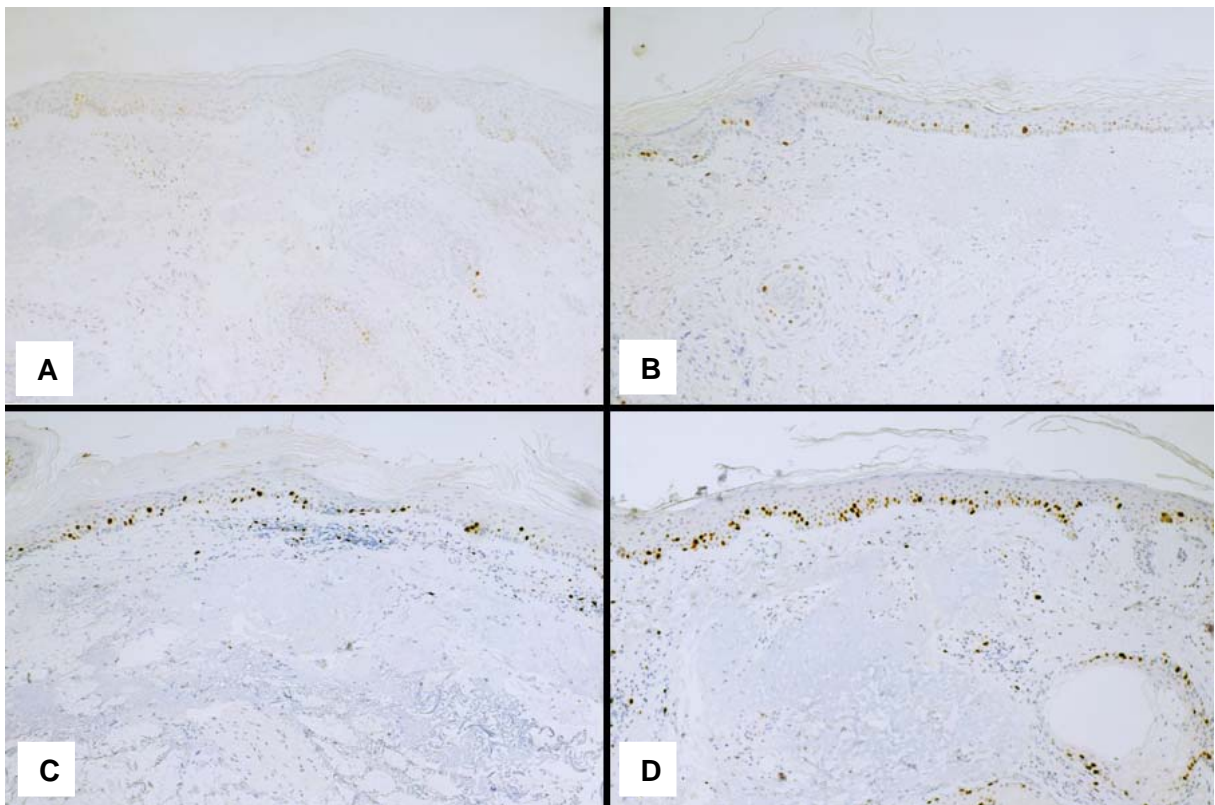


FIGURA 26. TIPOS DIFERENTES DE EXPRESIÓN ENCONTRADOS CON LA TINCIÓN IHQ PARA Ki-67. A, AUSENTE. B, BAJO. C, MEDIO. D, ALTO. MICROSCOPIA OPTICA (100X DE AUMENTO).

## COLÁGENO IV

El grosor del colágeno IV se midió en la lámina basal, cogiendo tres medidas - correspondientes a los 3 cuartiles-, 2 laterales y una central, hallando la media. Se repitió en los 3 cuartiles.

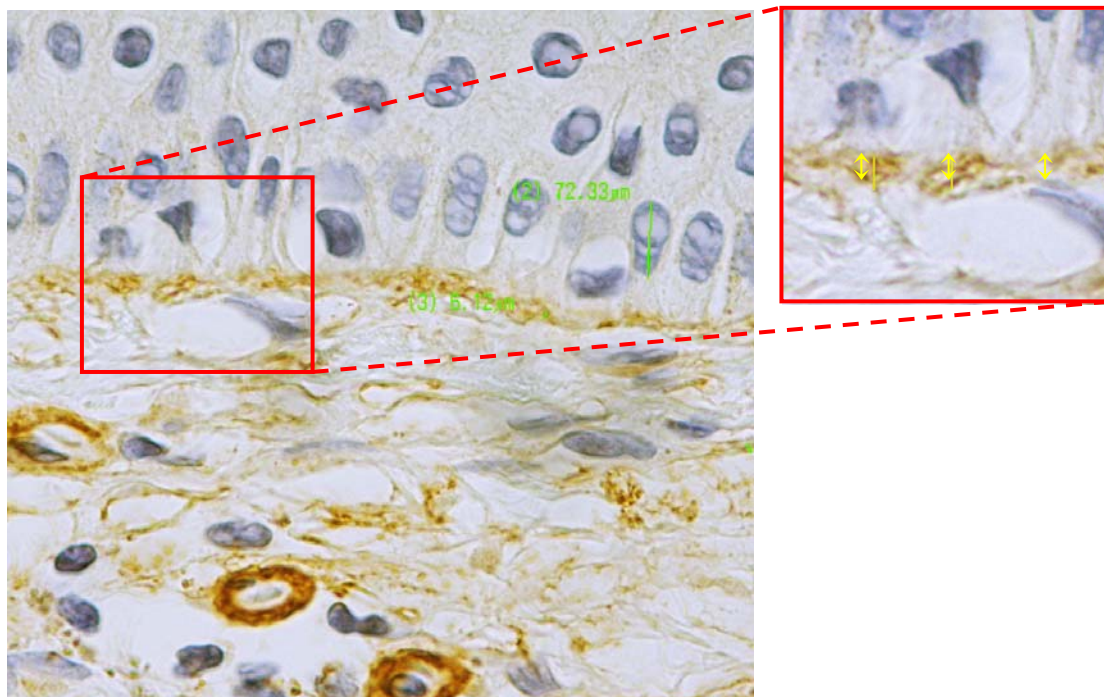


FIGURA 27. TINCIÓN IHQ PARA COLÁGENO IV, SE OBSERVA LA DISPOSICIÓN PARALELA A LA LÁMINA BASAL Y ALREDEDOR DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE LOS VASOS SANGUÍNEOS. DETALLE EN EL RECUADRO DE LAS MEDIDAS PARA CALCULAR EL GROSOR DE LAS FIBRAS DE COLAGANO DE LA LAMINA BASAL. MICROSCOPIA OPTICA (1.000X DE AUMENTO CON ACEITE DE INMERSIÓN).

---

## MÉTODO ESTADÍSTICO

---

Estadística descriptiva: como índices de la tendencia central y de la dispersión de las variables cuantitativas se emplearon la media aritmética ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (DE). Para las variables categóricas se emplearon las frecuencias absolutas y relativas porcentuales. La representación gráfica de las variables cuantitativas se efectuó mediante barras de error.

Estadística inferencial: la medida de asociación entre dos variables categóricas se efectuó mediante la  $\chi^2$  de Pearson. Para determinar la asociación entre una variable independiente dicotómica y dependiente cuantitativa de distribución paramétrica se empleó la t de Student para muestras dependientes. Se valoró el efecto mediante la diferencia de medias, y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En todos los casos, como grado de significación estadística se consideró un valor de  $p < 0,05$  y la aplicación estadística fue el paquete SPSS® versión 15 para Windows®.

## RESULTADOS

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LOS PACIENTES EN TRATAMIENTO DE QA DEL CUERO CABELLUDO CON TFD (N=37).

|                     |              |            |
|---------------------|--------------|------------|
| EDAD $\bar{x}$ (DE) |              | 79 (7,6)   |
| FOTOTIPO            | 0            | 0 (0%)     |
|                     | I            | 0 (0%)     |
|                     | II           | 29 (78,4%) |
|                     | III          | 8 (21,6%)  |
|                     | IV           | 0 (0%)     |
|                     | V            | 0 (0%)     |
|                     | VI           | 0 (0%)     |
| INTENSIDAD          | AUSENTE      | 0 (0%)     |
|                     | LIGERA       | 3 (8,1%)   |
|                     | MODERADA     | 23 (63,2%) |
|                     | INTENSA      | 11 (29,7%) |
| CALVICIE            | I            | 0 (0%)     |
|                     | II           | 0 (0%)     |
|                     | III          | 3 (8,1%)   |
|                     | IV           | 14 (37,8%) |
|                     | V            | 20 (54,1%) |
| FOTOENVEJECIMIENTO  | I            | 0 (0%)     |
|                     | II           | 0 (0%)     |
|                     | III          | 12 (32,4%) |
|                     | IV           | 25 (67,6%) |
| ANTECEDENTES        | NINGUNO      | 10 (27%)   |
|                     | AP DE RIESGO | 7 (18,9%)  |
|                     | QA           | 1 (2,7%)   |
|                     | CBC          | 7 (18,9%)  |
|                     | CEC          | 1 (2,7%)   |
|                     | QS           | 1 (2,7%)   |
|                     | PS           | 1 (2,7%)   |
|                     | VARIOS       | 9 (24,3%)  |

AP (ANTECEDENTES PATOLOGICOS) DE RIESGO, CBC (CARCINOMA BASOCELULAR), CEC (CARCINOMA ESPINOCELULAR), QS (QUERATOSIS SEBORREICA), PS (PSORIASIS).

- Edad: La media fue de 79 años con una desviación estándar de 7,6 (TABLA 3).
- Fototipo: Casi el 80% de los pacientes pertenecen al grupo II, que se corresponde con piel clara, y el 20% al grupo de fototipo III. No se encontraron los tipos 0, I, IV,V y VI (GRÁFICO 1).

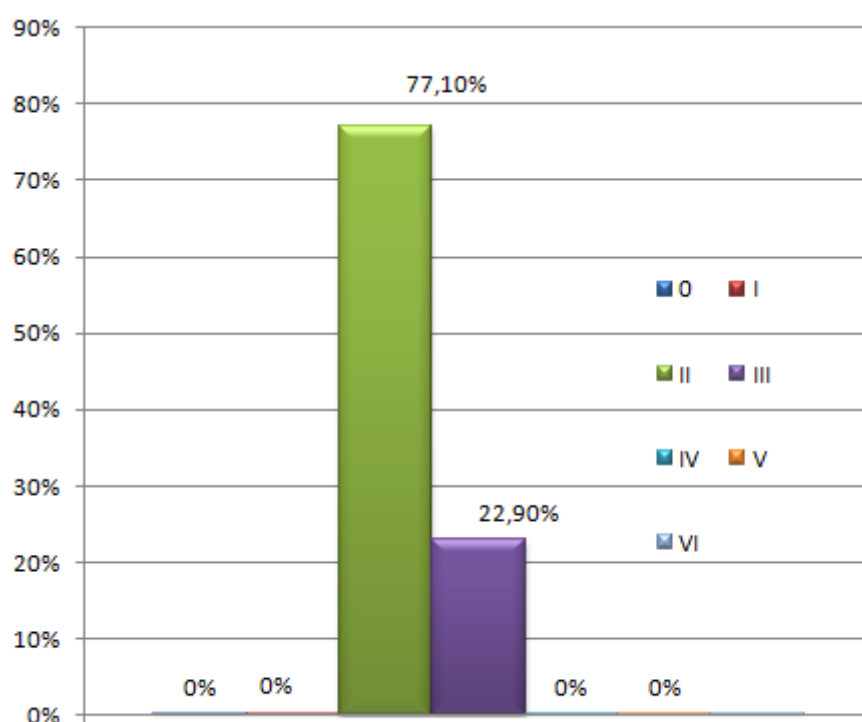


GRÁFICO 1. FOTOTIPOS.

- Intensidad: Casi el 92% presentaba de moderada/intensa (GRÁFICO 2).

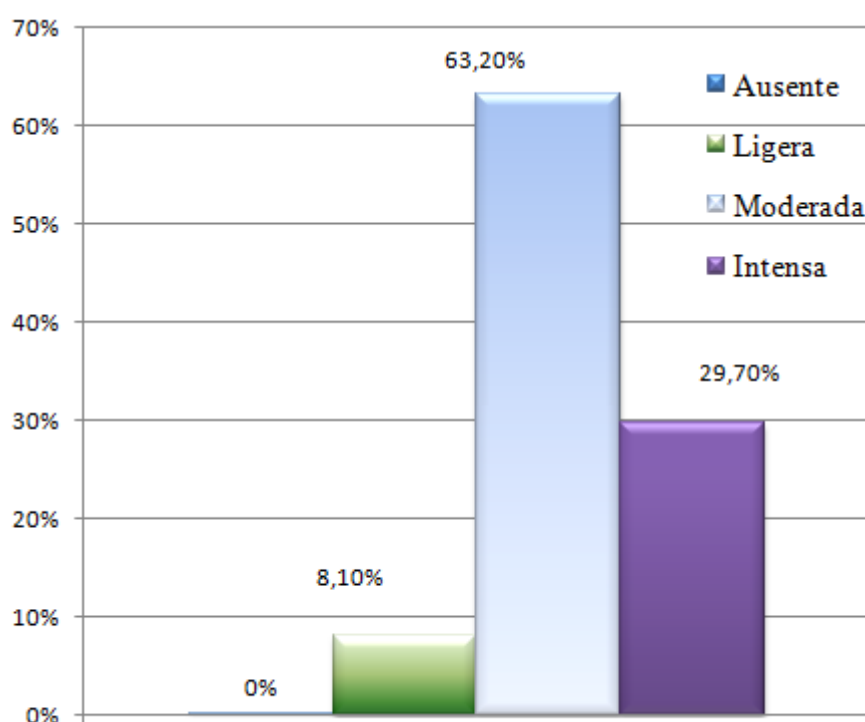


GRÁFICO 2. INTENSIDAD.

- Calvicie: 3 (8,1%) de los pacientes presentan grado III, 13 (37,8%) grado IV y 19 (54,1%) grado V de calvicie (Gráfico 3).

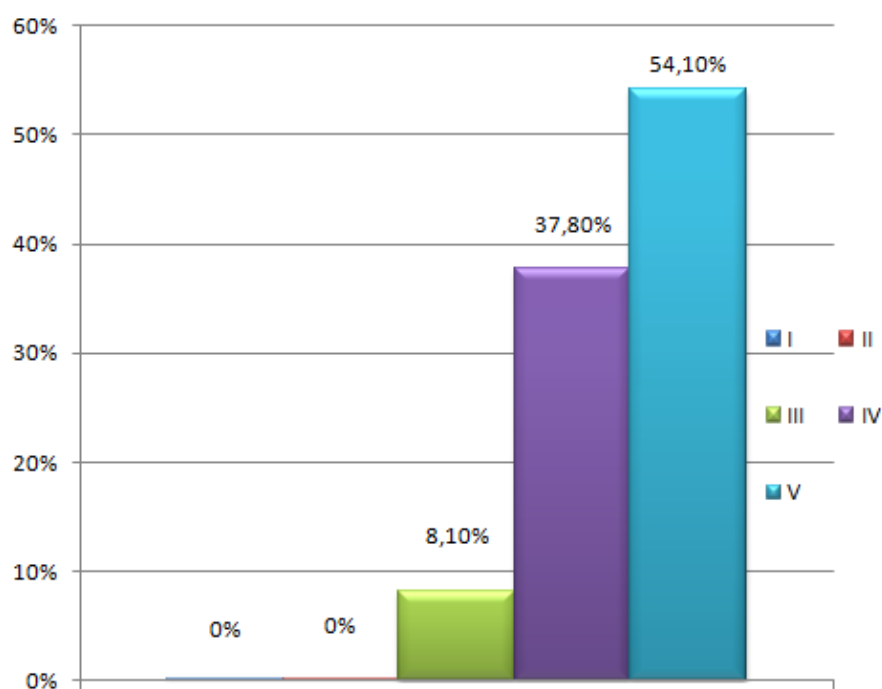


GRÁFICO 3. GRADO DE CALVICIE.

- Fotoenvejecimiento: No se encontraron los grados I y II. Sólo se encontraron los grados III en 34% frente al IV en 66% respectivamente (GRÁFICO 4).

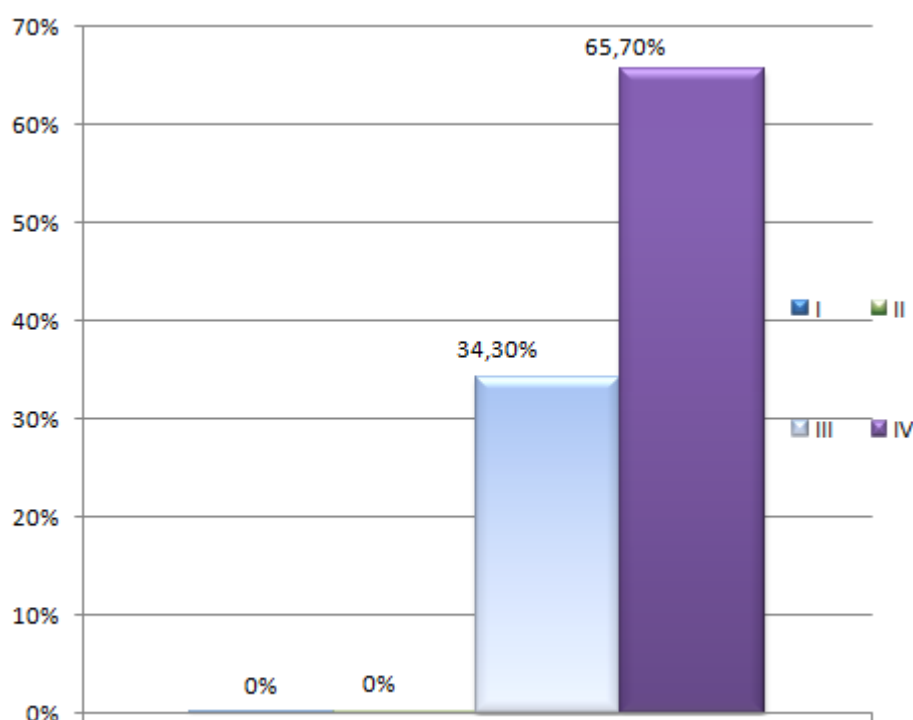


GRÁFICO 4. FOTOENVEJECIMIENTO.

- Antecedentes dermatológicos: El 30% no presentaban antecedentes patológicos de riesgo. El 18,9% de los pacientes han presentado un CB y el 2,7% un CE. Ambos relacionados con la exposición solar. Un 18,9% de los pacientes refirieron haber presentado quemaduras o haber recibido radiación UVA a lo largo de su vida (GRÁFICO 5).

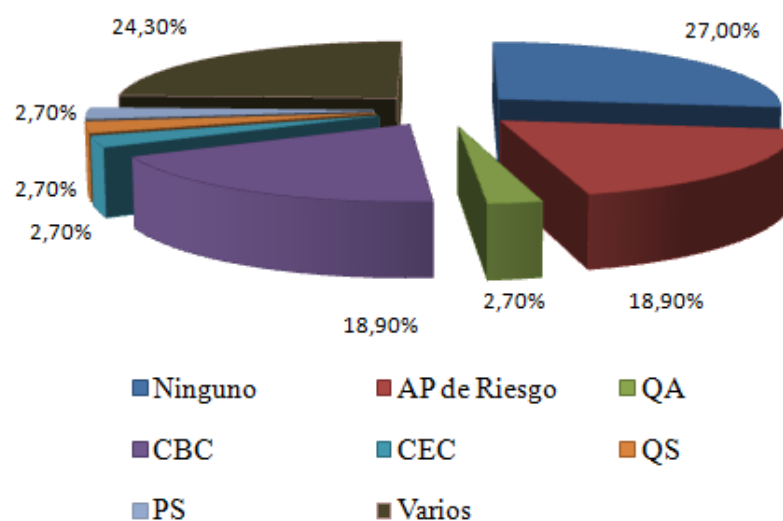


GRÁFICO 5. ANTECEDENTES DERMATOLÓGICOS.



TABLA 4. ACCIONES -EFECTOS- GENERADAS POR LA PATOLOGÍA, Y DEL TTO. CON TFD (N=37).

|                              |                         |            |
|------------------------------|-------------------------|------------|
| EFFECTOS SECUNDARIOS         | ERITEMA                 | 22 (62,9%) |
|                              | ERITEMA + DESCAMACIÓN   | 13 (37,1%) |
|                              | DESCAMACIÓN             | 0 (0%)     |
|                              | EDEMA                   | 0 (0%)     |
|                              | ULCERACIÓN              | 0 (0%)     |
|                              | VARIOS                  | 0 (0%)     |
| GRADO DE SATISFACCION        | 1                       | 0 (0%)     |
|                              | 2                       | 0 (0%)     |
|                              | 3                       | 0 (0%)     |
|                              | 4                       | 0 (0%)     |
|                              | 5                       | 1 (2,9%)   |
|                              | 6                       | 6 (17,1%)  |
|                              | 7                       | 9 (25,7%)  |
|                              | 8                       | 10 (28,6%) |
|                              | 9                       | 4 (11,4%)  |
|                              | 10                      | 5 (14,3%)  |
| RESULTADOS ESTETICOS         | NINGUNO                 | 0 (0 %)    |
|                              | BUENO                   | 15 (42,9%) |
|                              | MUY BUENO               | 20 (57,1%) |
| AÑOS CONSULTANDO MD (IQR)    |                         | 4 (6)      |
| NÚMERO DE CONSULTAS MD (IQR) |                         | 5 (5)      |
| TRATAMIENTOS ANTERIORES      | NADA                    | 4 (10,8%)  |
|                              | CRIOterapia             | 22 (59,5%) |
|                              | IMIQUIMOD               | 1 (2,7%)   |
|                              | CRIOterapia + IMIQUIMOD | 10 (27%)   |
|                              | CIRUGÍA                 | 0 (0%)     |
| POLIMEDICADO                 | SI                      | 12 (34,2%) |
|                              | NO                      | 25 (67,6%) |

- Efectos secundarios: El 60% presentaron eritema y el 40% eritema con descamación de la zona tratada. En el resto tanto descamación, edema, ulceración y varios, no se encontraron ninguno o sus combinaciones (GRÁFICO 6).

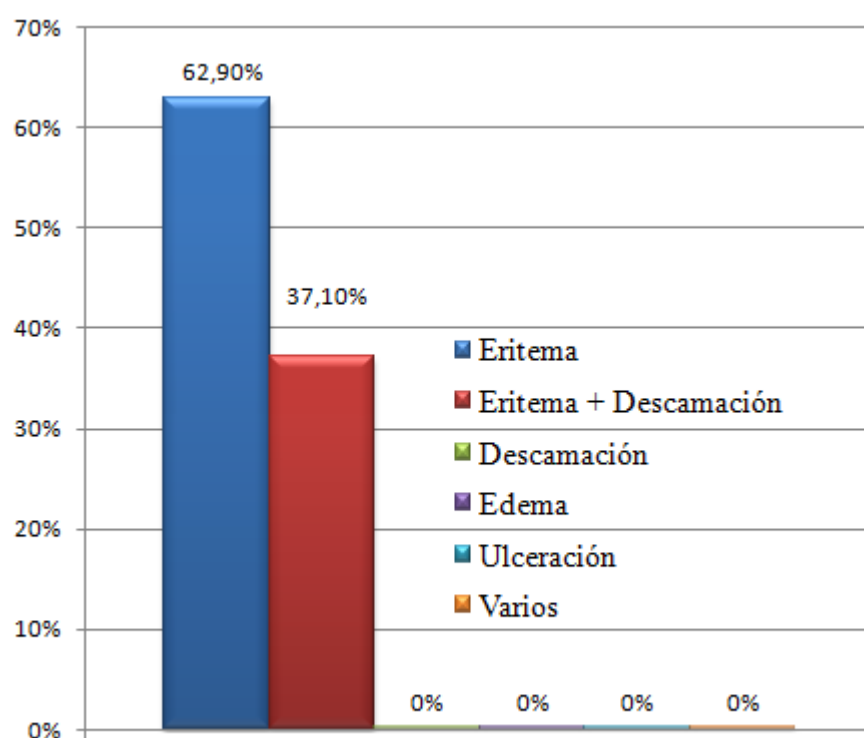


GRÁFICO 6. EFECTOS SECUNDARIOS.

- Grado de satisfacción: Se pidió a los pacientes que expresasen el grado de satisfacción sobre el nuevo tratamiento en una escala de 1 a 10. El 80% de los pacientes calificó el tratamiento con 7 puntos o más. Ningún paciente valoró por debajo de 5 (GRÁFICO 7).

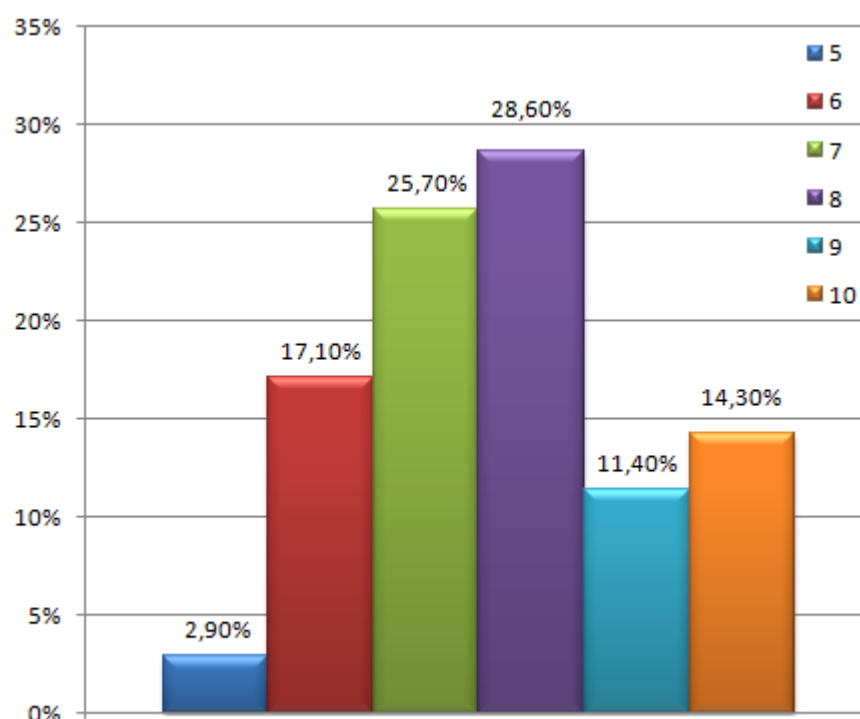


GRÁFICO 7. GRADO DE SATISFACCIÓN.

- Resultados estéticos: Casi el 60% de los pacientes obtuvieron un resultado muy bueno con el tratamiento, un 40% bueno (GRÁFICO 8).

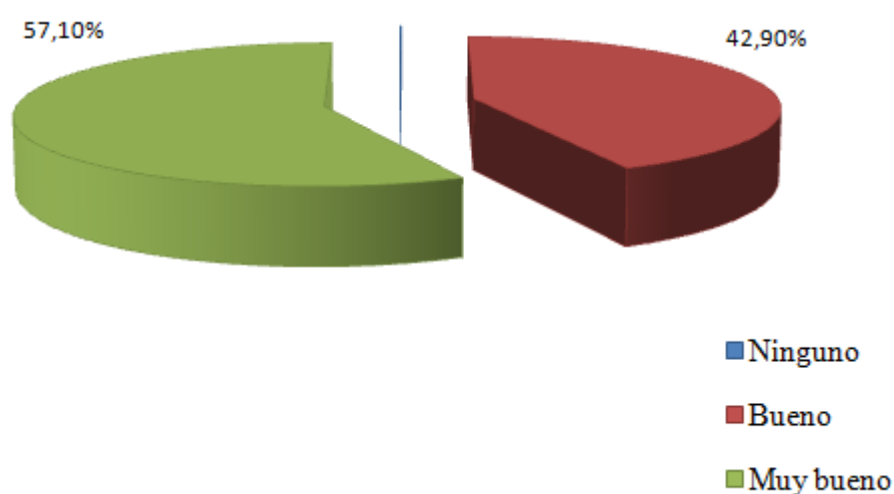


GRÁFICO 8. RESULTADOS ESTÉTICOS.

- Consultas y años: La media de años consultando fue de 4 años con un intervalo intercuartílico de 6, hay que destacar que 5 pacientes mostraron una dispersion exagerada con rangos intercuartilicos que superaban 20 años y uno más de 31 (GRÁFICO 9). La media de consultas fue de 5 con un intervalo intercuartilico de 5, sin embargo los años consultados fueron más homogéneos, no hubo dispersión que se observo, no se superaron los 13 años (GRÁFICO 10).

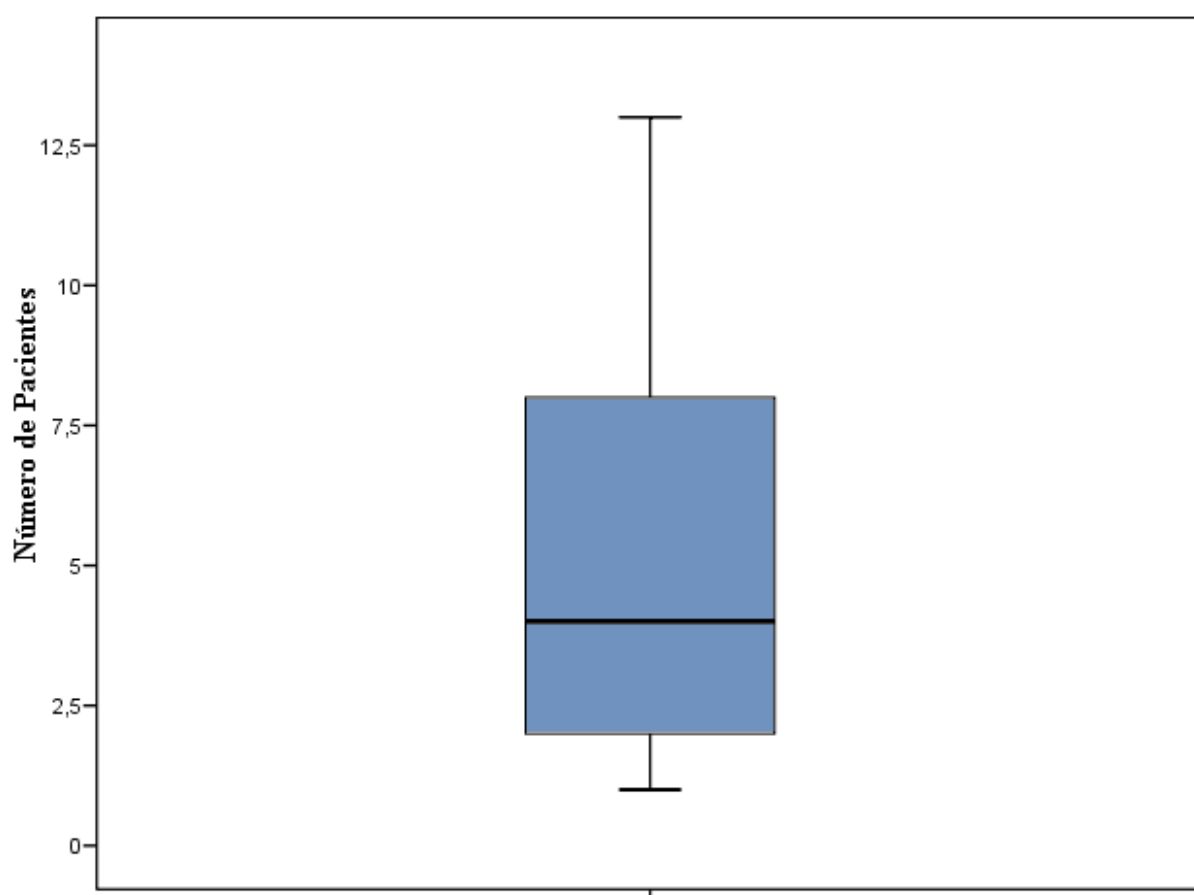


GRÁFICO 9. AÑOS.

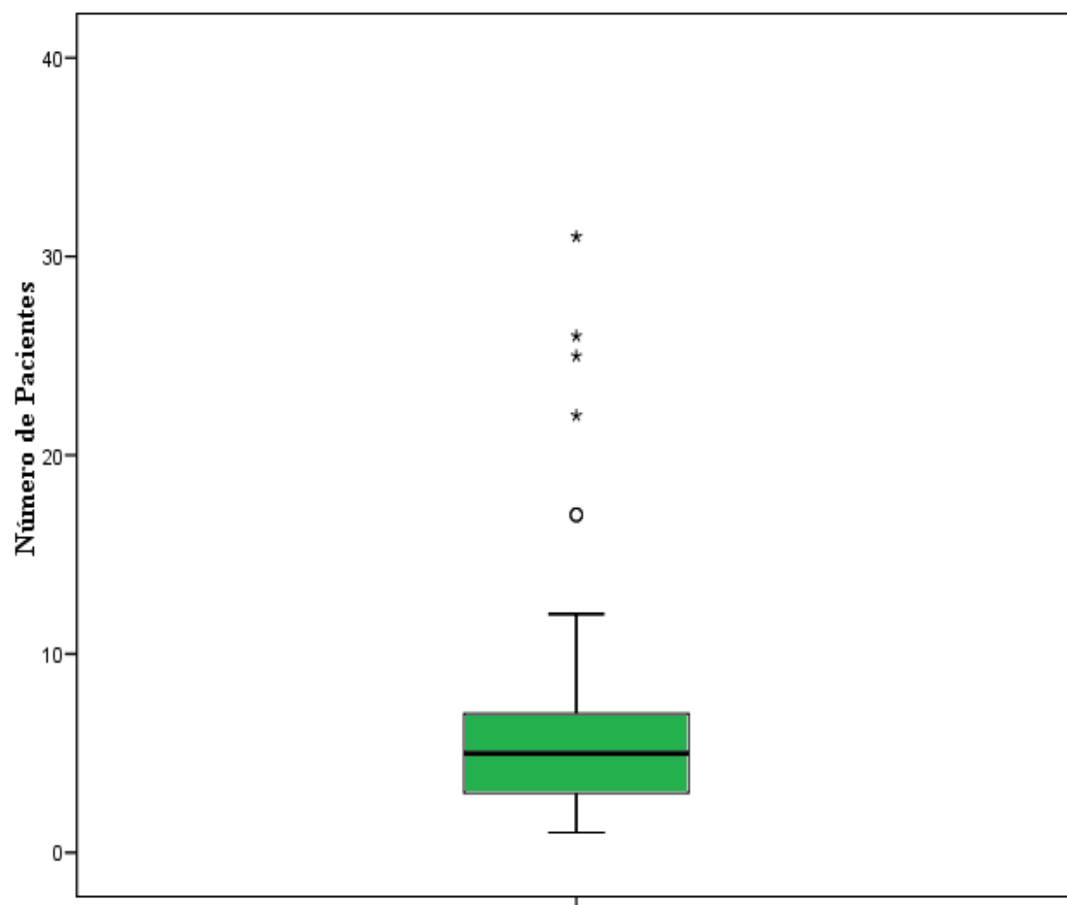


GRÁFICO 10. CONSULTAS.

- Tratamientos anteriores: El 90% de los pacientes ya habían probado otros tratamientos para las QA anteriormente, siendo la crioterapia el más utilizado 60% (GRÁFICO 11).

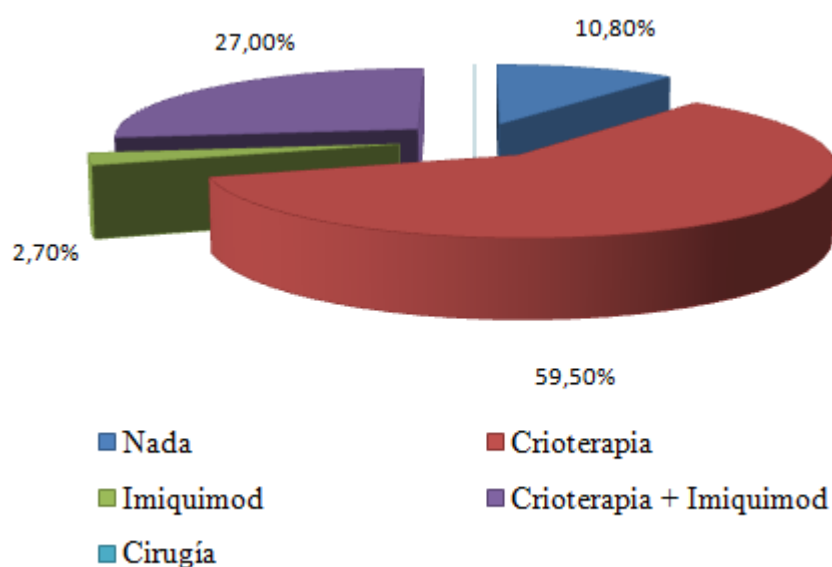


GRÁFICO 11. TRATAMIENTOS ANTERIORES.

- Medicación habitual: El 70% de los pacientes toman más de 3 fármacos como tratamiento habitual -estando entre ellos los anticoagulantes orales- (GRÁFICO 12).

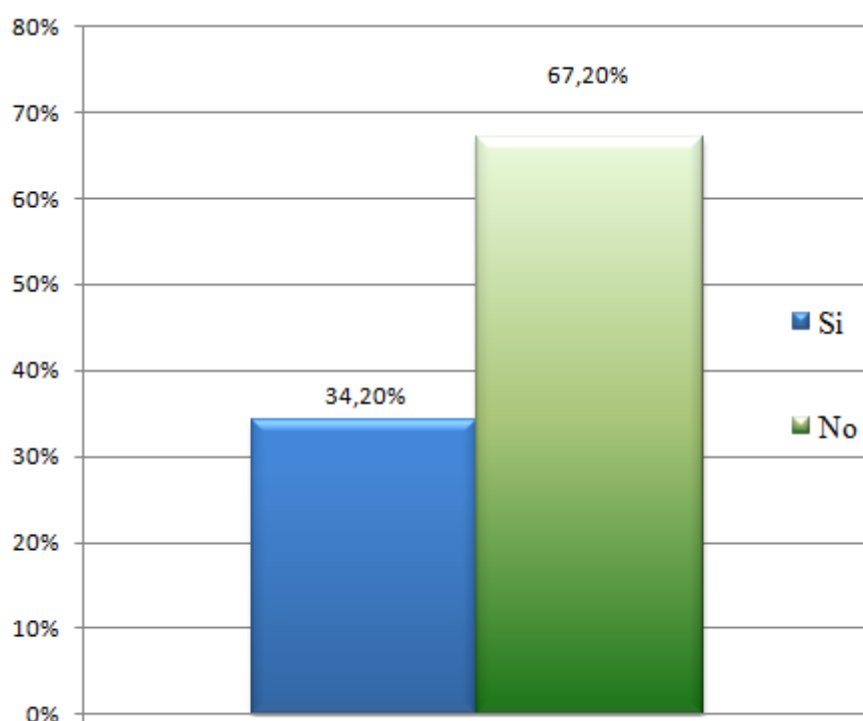


GRÁFICO 12. POLIMEDICADOS.

## EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TFD SOBRE LA EPIDERMIS, DERMIS E INFILTRADO INFLAMATORIO

TABLA 5. ESTUDIO COMPARATIVO DEL GROSOR DE EPIDERMIS, DERMIS E INFILTRADO INFLAMATORIO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LAS QA DEL CUERO CABELLUDO.

|                  |                | BASAL                    | FINAL                     | P        |
|------------------|----------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| GROSOR EPIDERMIS | $\bar{x}$ (DE) | 134 (31) $\mu\text{m}$   | 67,2 (17,2) $\mu\text{m}$ | <0,001 * |
| GROSOR DERMIS    | $\bar{x}$ (DE) | 1053 (247) $\mu\text{m}$ | 1136 (240) $\mu\text{m}$  | <0,001 * |
| INFILTRADO       | AUSENTE        | 0 (0%)                   | 15 (42,9%)                | 0,006 ** |
| INFLAMATORIO     | BAJO           | 12 (34,3%)               | 17 (48,6%)                |          |
|                  | MEDIO          | 11 (31,4%)               | 3 (8,6%)                  |          |
|                  | ALTO           | 12 (34,3%)               | 0 (0%)                    |          |

\* T DE STUDENT MUESTRAS APAREADAS

\*\*  $\chi^2$  DE PEARSON

- Epidermis: Se produjo un descenso de media 67,15  $\mu\text{m}$  -IC 95%: 60 a 74  $\mu\text{m}$ - en el grosor de la epidermis tras el tratamiento con TFD ( $p < 0,001$ ) (GRÁFICO 13).

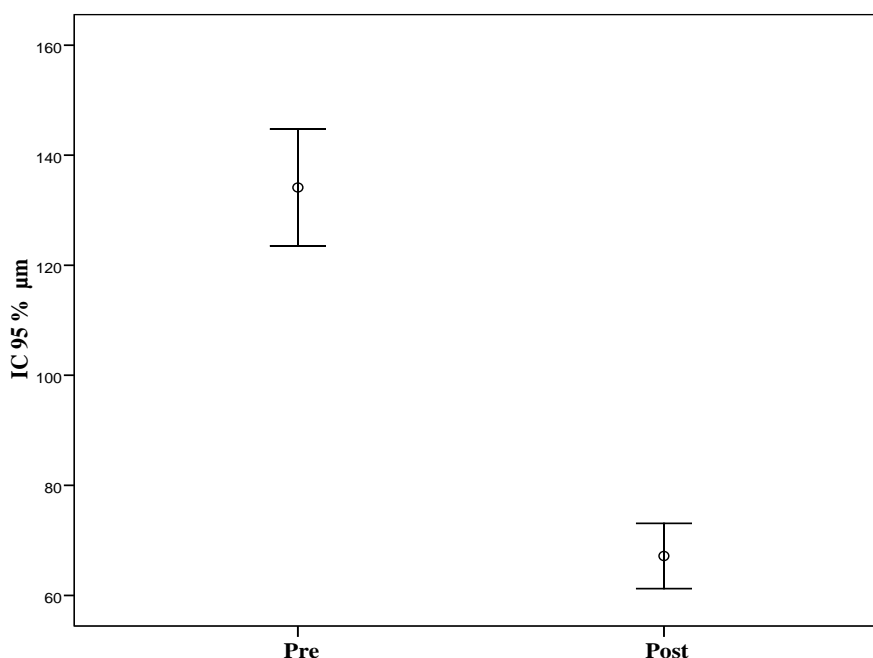


GRÁFICO 13. REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR DEL GROSOR DE LA EPIDERMIS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON TFD.

- Dermis: Se observó un incremento de la dermis tras el tratamiento con TFD de media  $82,8 \mu\text{m}$  -IC 95%: 70 a  $96 \mu\text{m}$ - ( $p < 0,001$ ) (GRÁFICO 14). También se detectó la aparición de una banda dérmica en todos los casos posterior al tratamiento situado en la dermis superior inmediatamente por debajo de la lámina basal de forma constante (FIGURA 28).

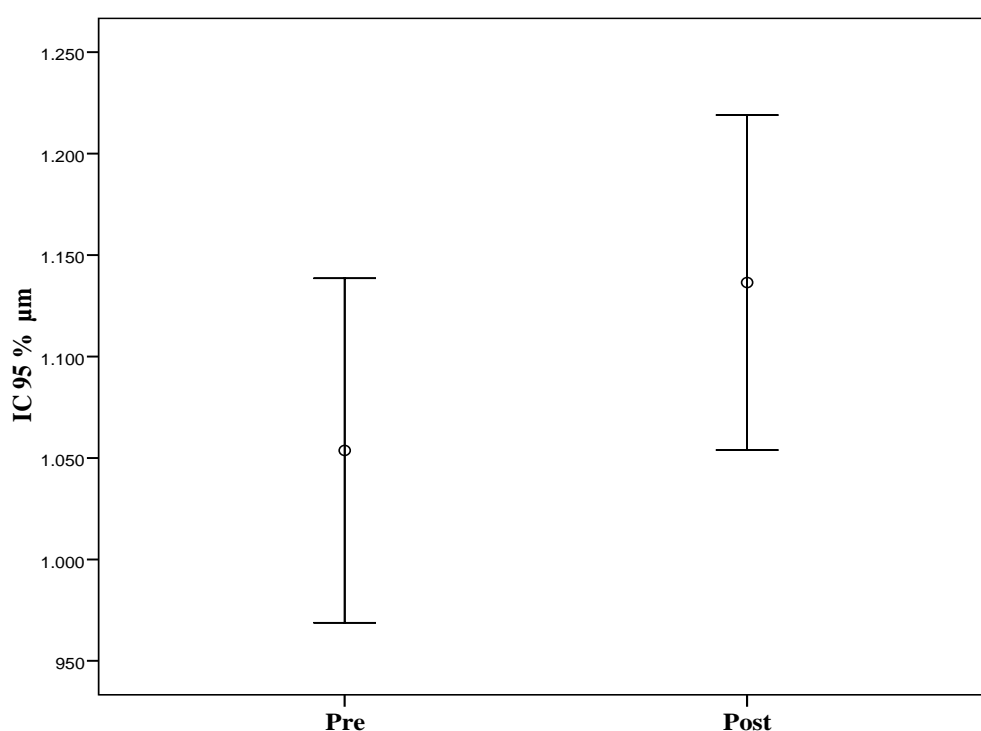


GRÁFICO 14. REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR DEL GROSOR DE LA DERMIS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON TFD.



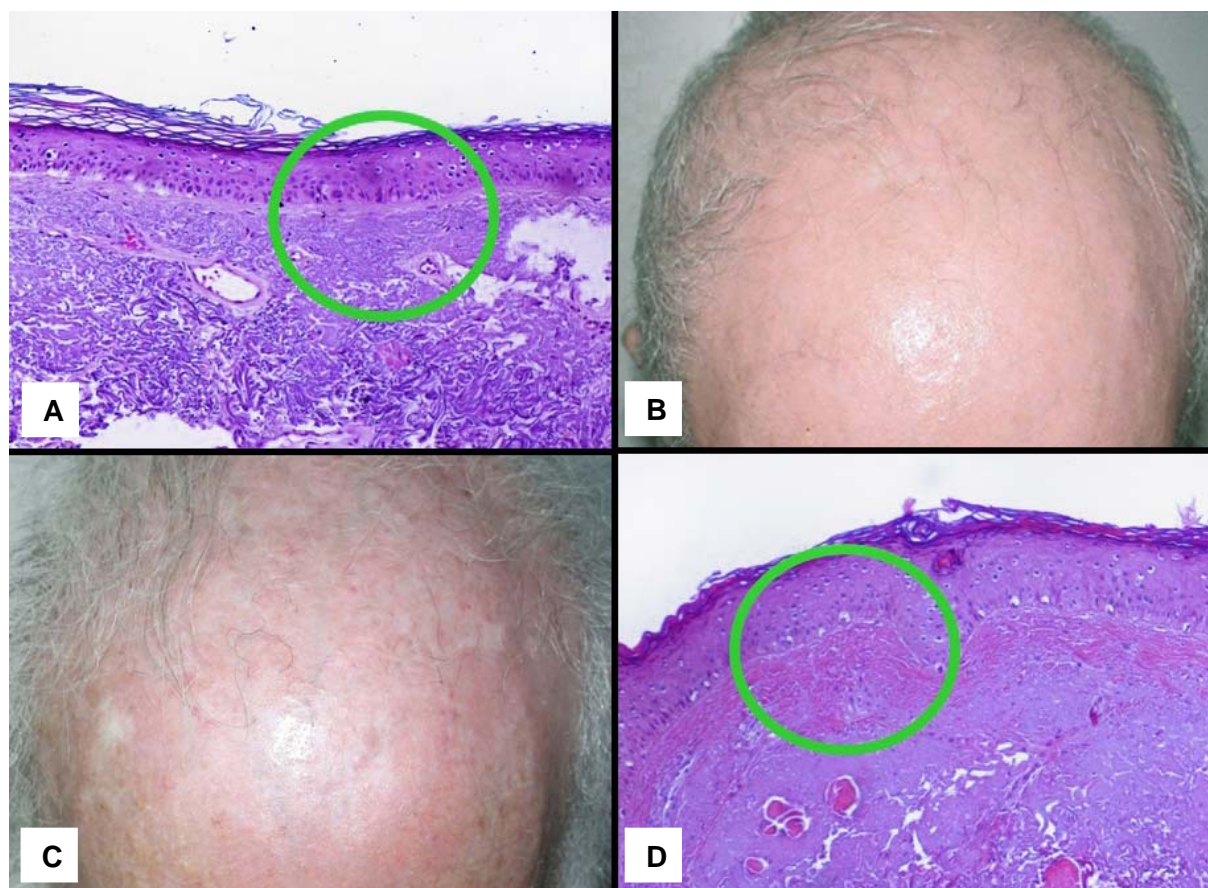


FIGURA 28. BANDA DÉRMICA -DENTRO DEL CIRCULO- DE APARICIÓN CONSTANTE EN TODOS LOS PACIENTES POSTERIOR AL TRATAMIENTO. A Y C, COLUMNA IZQUIERDA ANTES. B Y D, COLUMNA DERECHA DESPUES DEL TRATAMIENTO. COMPARATIVA CON LA FOTO CLINICA. MICROSCOPIA OPTICA, H&E (400X)

- Infiltrado inflamatorio: Se invirtió la frecuencia del infiltrado inflamatorio tras el tratamiento con TFD de valores medio/alto de aproximadamente 65% a bajo/ausente en un 90% ( $p=0,006$ ) (GRÁFICO 15).

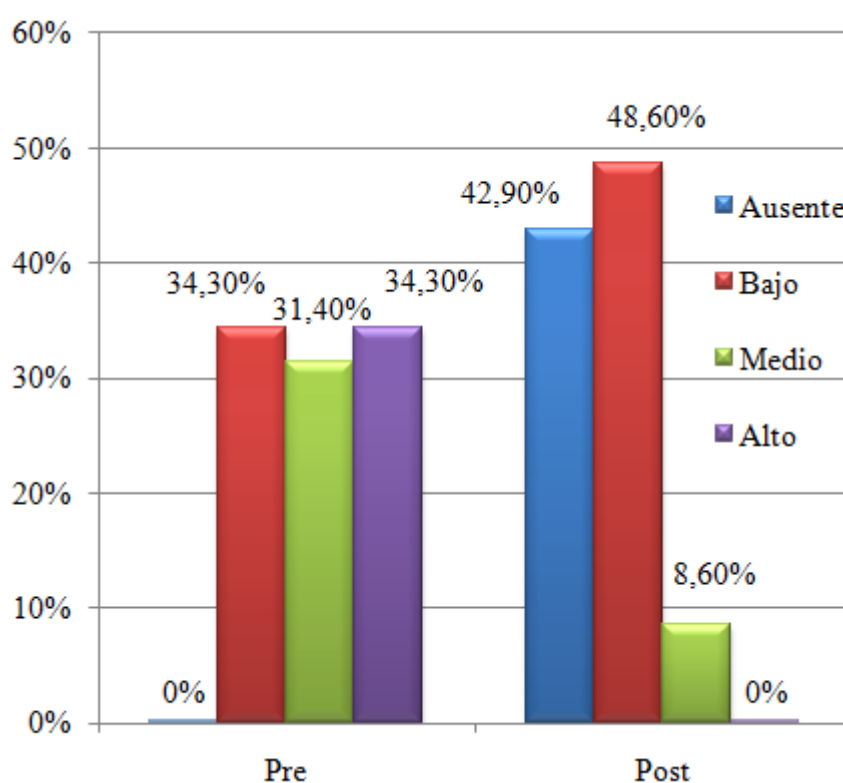


GRÁFICO 15. REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DEL GRADO DE INFILTRADO INFLAMATORIO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON TFD.

## EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TFD SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53, Ki-67 Y COLÁGENO IV.

TABLA 6. ESTUDIO COMPARATIVO DEL GROSOR DE EPIDERMIS, DERMIS E INFILTRADO INFLAMATORIO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LAS QA DEL CUERO CABELLUDO.

|                                      |         | BASAL                     | FINAL                     | P         |
|--------------------------------------|---------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| p53                                  | AUSENTE | 0 (0,0%)                  | 0 (0,0%)                  | <0,001*   |
|                                      | BAJO    | 5 (14,3%)                 | 13 (37,1%)                |           |
|                                      | MEDIO   | 13 (37,1%)                | 19 (54,3%)                |           |
|                                      | ALTO    | 17 (48,6%)                | 3 (8,6%)                  |           |
| Ki-67                                | AUSENTE | 5 (14,3%)                 | 5 (14,3%)                 | =1*       |
|                                      | BAJO    | 15 (42,9%)                | 15 (42,9%)                |           |
|                                      | MEDIO   | 15 (42,9%)                | 15 (42,9%)                |           |
|                                      | ALTO    | 0 (0,0%)                  | 0 (0,0%)                  |           |
| GROSOR DE COLÁGENO IV $\bar{x}$ (DE) |         | 0,48 (0,19) $\mu\text{m}$ | 2,09 (0,47) $\mu\text{m}$ | <0,001 ** |

\*  $\chi^2$  DE PEARSON

\*\* T DE STUDENT MUESTRAS APAREADAS

- P53: Se ha reducido el porcentaje alto de un 50% aproximadamente a casi un 10%, esta reducción del nivel alto incrementa el nivel medio en casi un 15% y el bajo duplicándolo de un 13,5% a 37,1%. No se observa el valor ausente antes y después del tratamiento ( $p < 0,001$ ) (GRÁFICO 16).

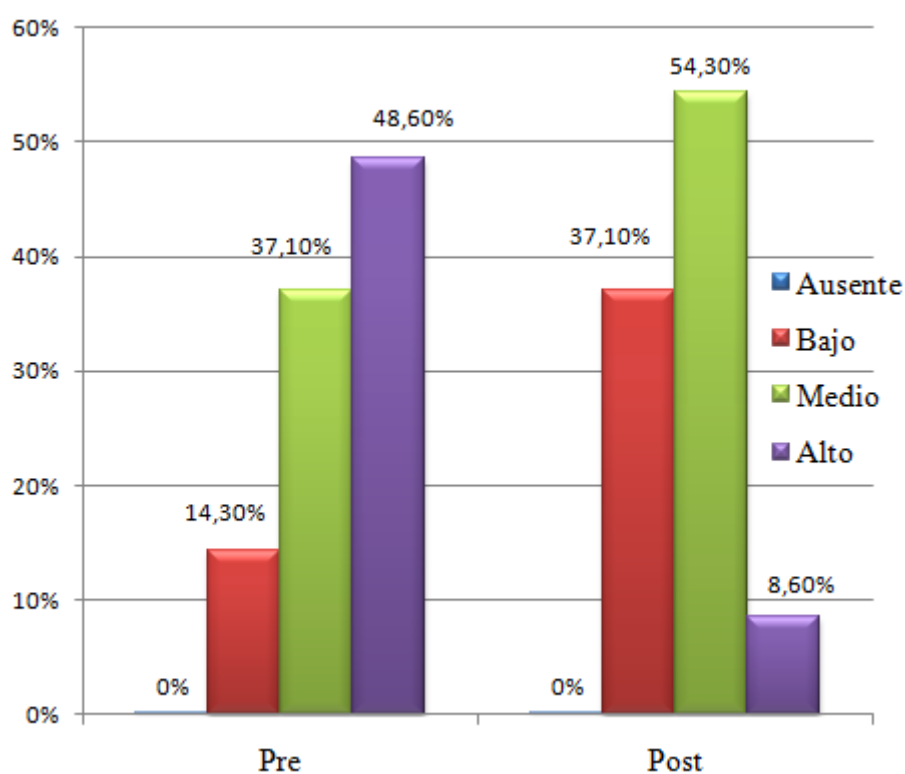


GRÁFICO 16. REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DEL GRADO DE EXPRESIÓN DEL DEL p53 ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON TFD.

- Ki-67: No hubo modificaciones, no son estadísticamente significativas. Se podrían considerar desde el punto de vista objetivo como nada relevantes ( $p < 0,001$ ) (GRÁFICO 17).

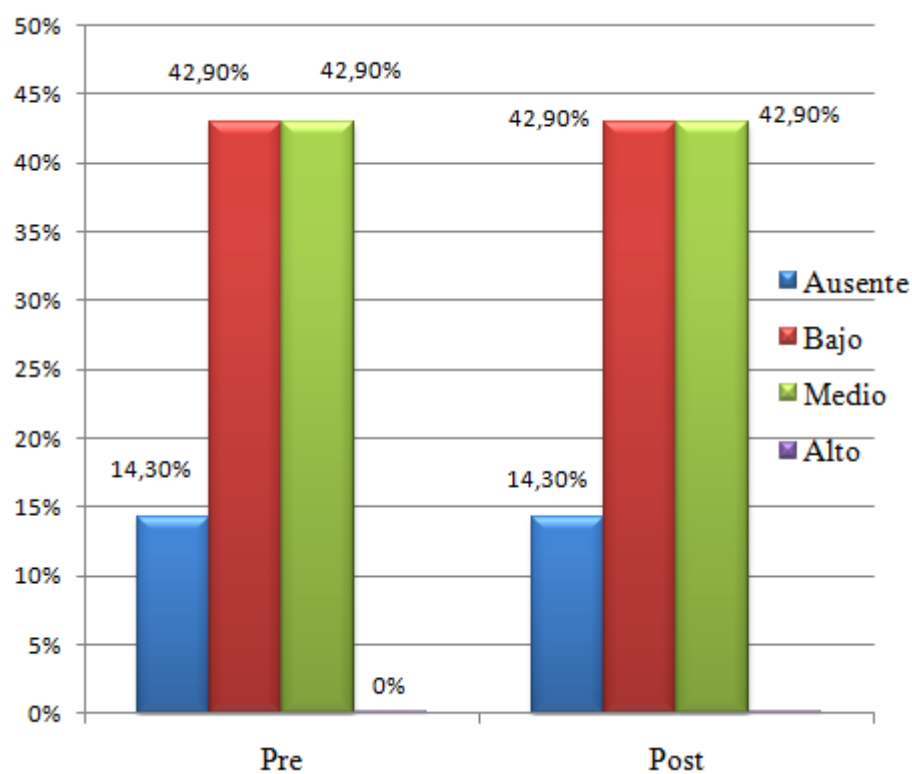


GRÁFICO 17. REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DEL GRADO DE EXPRESIÓN DEL Ki-67 ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON TFD.

- Colágeno IV: Se observó un incremento en el grosor del colágeno IV tras el tratamiento con TFD de media  $1,6 \mu\text{m}$  -IC 95%:  $1,5$  a  $1,7 \mu\text{m}$ - ( $p < 0,001$ ) (GRÁFICO 18).

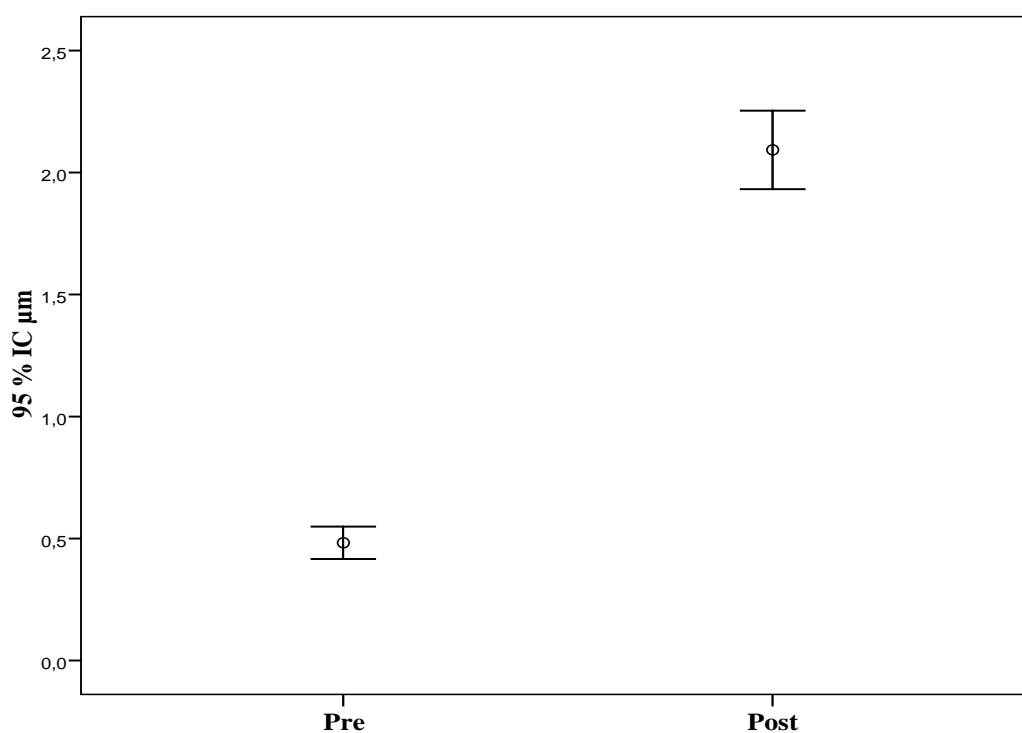


GRÁFICO 18. REPRESENTACIÓN GRÁFICA MEDIANTE DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR DEL GROSOR DE LAS FIBRAS DE COLÁGENO IV ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON TFD.

## DISCUSIÓN

---

## DISCUSIÓN

---

El cáncer más frecuente en el ser humano es el CCNM. El CE, es el segundo en frecuencia, después del CB, aunque su mortalidad es mucho mayor. Sigue una tendencia creciente. Las cifras se doblaron en España entre los años 1978-2002 en varones como en mujeres, más marcado en varones el aumento de la incidencia.<sup>183</sup> La exposición solar recibida a lo largo de la vida está directamente vinculada a su aparición, influida también por otros factores como la inmunosupresión o la infección el virus del papiloma humano (VPH).

El CCNM es uno de los pocos cánceres que la -exposición solar excesiva- lo produce, pudiéndose evitar. Una disminución en la exposición individual a radiación UV, evitaría el desarrollo posterior de un cáncer cutáneo. El protegerse de la radiación UV, puede disminuir su riesgo. No protegen completamente las prendas de vestir convencionales. Las nubes protegen en un 20-40%, por lo que el uso fotoprotectores debe ser diario, con independencia de si el día se encuentra soleado o no. El cristal permite el paso del 40% de la radiación UVA pero bloquea la radiación UVB.<sup>184</sup>

Tanto en UVB como UVA, la necesidad de protección, a la hora de prevenir tanto el fotoenvejecimiento y el cáncer como sus precursores tienen un mayor efecto con el uso de fotoprotectores de amplio espectro.<sup>185</sup> Ejercido por los UVA en la piel relacionado con la prevención del efecto inmunosupresor.<sup>186</sup>

Los programas de prevención primaria implantados hasta el momento para el CCNM, a diferencia del melanoma, orientados a una reducción en la exposición solar, descendiendo la incidencia de CE presentan un efecto positivo.<sup>187,188</sup>

En pacientes transplantados es de especial interés la prevención por ser subgrupos de población más predispuesta al desarrollo de CCNM, debido a los fármacos indicados para evitar el rechazo condicionándoles inmunodepresión. Presentan de forma temprana QA y CE, siendo más agresivos que en personas inmunocompetentes. Sabiendo que el uso diario de fotoprotección reduce la incidencia de CE, es recomendable su utilización en este tipo de pacientes.<sup>189</sup>

Una vez instaurado el daño actínico, disminuir la exposición solar debe ser la estrategia preventiva fundamental, terapia orientada a la prevención secundaria del CCNM. Tradicionalmente los retinoides, y más recientemente, los AINEs o la TFD, han sido utilizados con este fin.

La TFD es un tratamiento eficaz, seguro, bien tolerado y con un excelente resultado cosmético para el tratamiento de las QA. Su principal ventaja es la capacidad de tratar múltiples lesiones a la vez, tanto clínicas como subclínicas, ya que actúa a nivel celular. Los resultados de los estudios de la TFD en dermatología de los últimos años son prometedores y se encuentran en continuo desarrollo, tanto en indicaciones aprobadas - QA, epiteloma basocelular y enfermedad de Bowen- como no aprobadas.<sup>190</sup> Los estudios hasta ahora publicados en la literatura del tratamiento de pacientes con múltiples QA



con MAL y luz roja son prospectivos, aleatorizados y con un diseño controlado y cerrado.<sup>191,192</sup>

En las publicaciones anteriores se tratan y se cuentan las lesiones de forma individual, en otras ocasiones se trata por localizaciones y se valoran por número de lesiones y localización analizando el porcentaje de mejoría. En nuestro caso, una vez que el paciente cumple con los requisitos, la evaluación es más sencilla pues se basa en mejoría total con desaparición completa de las lesiones o resultado bueno con discreta persistencia de alguna lesión para considerarlos como buenos resultados. Esto, cuando se une a unos buenos resultados cosméticos, se traduce en una mejoría cualitativa y cuantitativamente de la piel del área tratada.

Con el fin de comprobar la efectividad de la TFD a nivel clínico, diversos autores han hecho trabajos en pacientes trasplantados. La mayoría comparando con áreas no tratadas, han observado un retraso y una reducción en el número de QA en las áreas tratadas con TFD.<sup>193,194,195</sup>

Graaf y col,<sup>196</sup> encuentran diferencias en la aparición de lesiones hiperqueratósicas en pacientes trasplantados, entre el brazo tratado con TFD, respecto al contralateral, sin tratamiento. Cuestionado por diferentes motivos metodológicos y terapéuticos.

En el presente trabajo se seleccionaron pacientes con múltiples QA -mayor o igual a 5-, que serían, en principio, los candidatos ideales para esta técnica.

Se incluyeron además a los pacientes con QA hipertróficas, las cuales se trataban previamente con vaselina salicilica al 10 % -una aplicación por la noche durante 10 días- y posterior curetaje, ya que constituían un número considerable de los pacientes atendidos.

Con estos criterios de inclusión se observa en las características básicas una clara predominancia en pacientes añosos. La relación directa de las QA con la exposición solar acumulada explica que aparezcan en pacientes de edad avanzada, quizá debido a una mayor exposición solar a lo largo de la vida por trabajos al aire libre y a la mayor frecuencia de calvicie grado V que deja expuesto el cuero cabelludo.

Predominaron también los fototipos bajos, correspondientes a una piel más clara, y por lo tanto más sensible a los efectos de la exposición solar. La media de fotoenvejecimiento fue de grado alto, lo que muestra la relación entre la exposición solar acumulada y la aparición de QA.

En los antecedentes dermatológicos un tercio no presentaban antecedentes patológicos de riesgo. Otros como CB y CE, ambos relacionados con la exposición solar.

En los efectos secundarios más importantes se encontró eritema de la zona tratada. En el grado de Satisfacción la mayoría calificó el tratamiento con una alta puntuación. En los resultados estéticos muy buenos.

Con las consultas y años una media de 4 años consultando. En cuanto a tratamientos anteriores la mayoría de los pacientes ya habían probado otros

tratamientos para las QA anteriormente, siendo la crioterapia el más utilizado. Respecto a la medicación habitual las dos terceras partes de los pacientes toman más de 3 fármacos como tratamiento habitual -estando entre ellos los anticoagulantes orales-. Siendo publicadas revisiones sobre el tema.<sup>197,198,199</sup>

## HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

### HEMATOXILINA & EOSINA

Como ya ha sido descrito en el apartado de resultados, de modo global tras la TFD se observó en nuestros pacientes una reducción del grosor de la epidermis. Park y col, encuentran resultados similares.<sup>200</sup>

En el grosor de la dermis se observó lo contrario al anterior, incremento tras el tratamiento con TFD. Se pudo evidenciar de forma constante -en todos los casos- la aparición de una banda dérmica adyacente a la lámina basal -dermis papilar-, de aspecto uniforme que podría justificar este aumento del grosor (FIGURA 28). A esta banda algunos autores la llaman zona de Grenz,<sup>201</sup> que significa zona de neoformación, aunque el término a los anatomopatólogos lo utilizan para zonas previas de infiltración tumoral, en este caso sería más bien una banda dérmica neoformada que estaría en relación con la formación de neocolágeno, correlacionado con un aumento del colágeno de tipo IV medido en el presente estudio. Podría interpretarse también que es hasta ese lugar la penetración de la luz roja, y que la acción producida en la epidermis genera una respuesta a nivel de dermis alta.

En cuanto al Infiltrado inflamatorio se invirtió la frecuencia del infiltrado inflamatorio tras el tratamiento con TFD hacia una disminución o desaparición del mismo. Existen estudios con luz roja donde llegan a la conclusión de que la disminución o desaparición del infiltrado inflamatorio, tendría un efecto directo en la inmunidad celular haciendo que otras patologías en la zona tratada se disparen.<sup>202</sup>

Son consistentes estos hallazgos con todo lo descrito en la literatura, encontrándose concordancia entre la efectividad en el tratamiento de las QA, y el efecto terapéutico de la TFD.

Una mayor efectividad de dos sesiones de TFD frente a una, apoyan y avalan varios estudios. Encuentran una tasa de respuesta de casi 40% en una sesión frente a 90% tras la segunda sesión Pariser y col.<sup>203</sup> También encuentran tasas de respuesta de 70% -1 sesión- frente a 90% -2 sesiones- Piacquadio y col.<sup>204</sup> Son estudios sin confirmación histológica, pudiendo ser mayor la persistencia real -histológica- de las QA. Diferencias significativas entre la realización de un tratamiento con TFD y dos en el caso de las QA gruesas o con mala respuesta encuentran Tarstedt y col. Los resultados con dos sesiones son similares a un único tratamiento en QA finas.<sup>205</sup>

La efectividad para revertir los daños epidérmicos ocasionados por la radiación UV en la epidermis se observa a nivel histológico, en que la TFD es capaz de eliminar por completo los signos de QA. Aunque clínicamente aún no se observen las QA, podría utilizarse de un modo preventivo en piel con daño actínico severo.

#### COLÁGENO IV

En el presente trabajo se observó un incremento en el grosor de las fibras de colágeno tras el tratamiento fotodinámico. Este hallazgo se traduciría clínicamente como una disminución de la profundidad y el número de las arrugas cutáneas -formación de neocolágeno-. Aunque la utilidad de este efecto sea fundamentalmente estético, es de suma importancia dado que la elastosis acompaña casi inevitablemente al proceso de carcinogénesis cutánea por UV y su reversión indicaría de alguna manera el frenado de este proceso.

Algunos autores en estudios similares consideran que el aumento de fibras de colágeno tras 2 sesiones de TFD, como tratamiento de QA en la piel de la cara, sería un buen marcador de fotorrejuvenecimiento.<sup>200</sup>

Con lo ya observado por otros autores utilizando tanto ácido a-aminolevulínico (ALA) como MAL, estos datos son consistentes. Es probable que, a pesar de haber obtenido resultados estadísticamente significativos con 2 sesiones de TFD, este efecto esté relacionado con el número de tratamientos, siendo así, se podría alcanzar una desaparición completa del material degenerado a mayor número de sesiones.<sup>206</sup>

#### EXPRESIÓN DEL p53

El p53 no se expresa en piel normal, como ya se ha expuesto en la introducción. Es patente en piel fotoexpuesta, pretumoral y tumoral, su expresión.<sup>207</sup> No es posible saber si la sobreexpresión observada es del p53 mutado o nativo, en la valoración inmunohistoquímica.<sup>208</sup> La proteína mutada es mucho más estable, que la funcional, por lo que la mutación se asocia a sobreexpresión.

Pequeños agregados o "clusters" presenta el patrón de tinción del p53 en las QA, el p53 mutado que representan los clones de células portadoras. Las QA son originadas de estos agregados de células que sobreexpresan el p53 -probablemente mutada-, a partir de una mutación diferente.

Los CE sobreexpresan el p53 en torno a la mitad de los casos, entre un cuarto hasta la mitad lo expresan en las QA.<sup>208,209,210</sup> En piel normal fotoexpuesta el p53 se expresa.<sup>214</sup>

En el presente trabajo en coincidencia con lo ya descrito en la literatura, el patrón del p53 observado: en la epidermis con QA se observaron pequeños agregados de células p53-positivas salpicadas.

En los cánceres humanos, el gen p53 es uno de los genes supresores de tumores más habitualmente implicados. En el CCNM su papel se encuentra bien definido,

presentando mutación específica de la radiación UVB. Por medio de mecanismos oxidativos inducidos por UVA, puede dañarse indirectamente. Presenta la función de detener el ciclo celular –fisiológicamente- para la reparación del DNA. Induce apoptosis, en el caso de que este mecanismo falle, con el fin de evitar la perpetuación del DNA dañado en la célula portadora. Esta -vigilancia- del DNA no se lleva a cabo de forma correcta, si sucede una mutación, alterandose su función en el gen del p53.

Es capaz de eliminar al parecer selectivamente los agregados de células portadoras de mutación en el p53, el tratamiento con TFD. Supondría una reversión en el proceso de carcinogénesis, la reducción significativa de su expresión en la epidermis con daño solar crónico indicando la ausencia del p53 disfuncionante.

No está claramente definido el mecanismo por el que esto ocurre. Esta selectividad de la TFD por las células malignas o premalignas, tradicionalmente se ha postulado que se debía a algún tipo de activación metabólica, quizás en la vía del grupo Hemo, que implicaría una mayor producción de protoporfina IX (PpIX).<sup>216,217,211,212,213</sup> En otros tejidos, como cérvix, mama o vejiga, aunque sí se haya visto esto no ha podido ser demostrado en la piel actualmente.<sup>218</sup> En queratinocitos malignos una mayor producción de PpIX, se ha comprobado que es debida a los defectos presentes en la capa córnea de este tipo de lesiones, permitiendo una mayor entrada del fotosensibilizante y por tanto una mayor cantidad de sustrato que participaría en la vía de síntesis del grupo Hemo, aumentando la cantidad de PpIX final.

En piel lesionada -QA, CE-, al ser la expresión del p53 más frecuente, es natural pensar que serán más fácilmente destruidas por la reacción fotodinámica las células mutadas.

No se observa negativización total de este marcador, aunque la disminución de la expresión del p53 sea significativa. Aunque la TFD ha demostrado ser efectiva para la reducción de este marcador, indicaría que -2 sesiones de tratamiento- no es suficiente para la desaparición de su expresión y por ende la reversión del daño actínico.

En el modelo animal, estos resultados concuerdan con los obtenidos en experimentos realizados, en que encuentran unos niveles del p53 comparables entre el grupo de animales control y el grupo sometido a UV+TFD.<sup>215</sup> Recibieron un total de 5 sesiones con TFD, ratones sometidos a TFD, lo que apunta a que un mayor número de sesiones puedan obtenerse resultados similares en el caso humano y por ende los efectos de la TFD son claramente dosis-dependientes.<sup>215</sup>

## EXPRESIÓN DE Ki-67

El ki-67 se expresa en todas las fases del ciclo celular, salvo en G0 siendo un marcador nuclear. Se expresa de forma fisiológica, como marcador de proliferación celular en las células de la capa basal de la epidermis.

En QA está aumentada la expresión del ki-67 revelando una mayor actividad proliferativa que en la piel sana no fotoexpuesta.<sup>214</sup> Dando lugar a un crecimiento

desordenado de los queratinocitos, esta hiperactividad proliferativa en las QA traduce histológicamente la displasia queratinocítica, de predominio basal.

Tras TFD se observó que no se produjo alteración en el número de células positivas para el ki-67, lo que traduce en el mantenimiento de la proliferación queratinocítica.

Encuentran una disminución en el número de células positivas para el ki-67 en estudios similares, conseguidos en el modelo murino, sometido en laboratorio, a exposición crónica de luz UV. La expresión del ki-67 es equivalente a la observada en la piel de ratones del grupo control de animales que recibieron tratamiento preventivo con TFD.<sup>215</sup>

La TFD podría causar la reducción del número de células en proliferación por dos mecanismos. El primero, dada la mayor penetración del fotosensibilizante por defectos en el estrato corneo, por un daño no selectivo del área lesional, propios de las QA. Destruyendo en su conjunto y quedando tejido sano sin hiperactividad proliferativa, tras la reacción fotodinámica dada de forma homogénea.

El segundo mecanismo, mayor actividad de la vía del grupo Hemo en células con alta tasa proliferativa en otros tejidos diferentes a la epidermis,<sup>216,217</sup> sin ser demostrado.<sup>218</sup> Podría ocasionar la eliminación selectiva de estas células, un aumento en la producción de PpIX en las células con expresión del ki-67, en comparación con el resto de queratinocitos epidérmicos.

Ensayan la eficacia de una sesión frente a dos sesiones, trabajos realizados anteriormente con MAL y TFD para las QA,<sup>219</sup> o efectúan el tratamiento con dos sesiones a todos los pacientes.<sup>220,221</sup> En nuestro estudio evaluamos a todos los pacientes con 2 sesiones consideradas suficientes para obtener una respuesta clínica adecuada.

En pacientes preferentemente varones de avanzada edad con fototipos bajos y grados altos de fotoenvejecimiento, las QA numerosas y extensas, precisan tratamiento con TFD, por constituir un problema sanitario. Reciben tratamientos para otras patologías, viéndose obligados a consultar por las QA durante muchos años en reiteradas ocasiones para recibir tratamientos tipo crioterapia o imiquimod.

En estos pacientes es necesario hacer frente al problema de las lesiones premalignas o malignas *in situ*, un problema nuevo que no se contemplaba hasta hace poco, ya que ocurría en personas con escasa presencia social. Limitándose los tratamientos existentes a tratar ciertas zonas concretas de la piel, no abordándose el problema en su totalidad.

La gran aceptación de los pacientes hacia este tratamiento con la aplicación de dos sesiones, unos resultados buenos o muy buenos, revela en nuestro medio como un método eficaz y seguro de tratamiento de las QA, ya que orienta de forma extendida el problema de los campos de cancerización, según el perfil de los pacientes estudiados, aspecto de primordial importancia.

---

## IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS

---

En coincidencia con distintas publicaciones en la literatura, los resultados obtenidos en el presente trabajo, tanto de carácter clínico e histológico, de especial interés en pacientes inmunodeprimidos o con genodermatosis que apuntalan el papel no sólo terapéutico sino también preventivo de la TFD.

El efecto preventivo a nivel molecular por este tratamiento es clave a la hora de comprender los mecanismos implicados. La disminución de la expresión del p53, así como el mantenimiento de la actividad proliferativa epidérmica, medida por el ki-67, registran un efecto de reversión de cambios histológicos y genéticos fundamentales y descritos en el desarrollo del CE.

Siendo un tratamiento dirigido a patología tumoral, es de especial interés que la TFD, tubiera consecuencias no deseables a largo plazo -alteraciones moleculares aún no conocidas-. A fin de corresponder su expresión con posibles recidivas se necesitan estudios adicionales de expresión de esta proteína en el período postratamiento.

La desaparición de los marcadores estudiados es debida -como se ha propuesto tradicionalmente - a una selectividad de la TFD o sólo a un daño de aquellas áreas de piel con un estrato córneo imperfecto, como lo postularon otros autores.<sup>222</sup>

Este trabajo permite la apertura de nuevas líneas de investigación en este campo, perfeccionando factores que han podido limitar el presente, como el de combinar diferentes tipos de tratamientos para comparar los resultados. Una más precisa explicación de resultados, como la selectividad de la TFD.

Es un tratamiento sencillo, con cuidados mínimos del personal de enfermería. Baja tasa de efectos secundarios comparado con tratamientos tópicos. Activa mecanismos fisiológicos. Permite controlar el seguimiento del paciente evitando abandonos como sucede con las cremas, ya que los varones son más reticentes a usarlas. Económicamente viable si se evita llegar al CCNM.

---

## LIMITACIONES DEL TRABAJO

---

El haber realizado dos tratamientos diferentes en todos los casos podría haber permitido la obtención de diferencias más significativas, apreciándose mejor los cambios causados por la TFD. Habiéndose descrito una mejor respuesta en QA tratadas con 2 sesiones de TFD, es razonable pensar que las diferencias histológicas también habrían sido mayores a mayor número de sesiones.

Existen limitaciones logísticas que podrían introducir un sesgo de selección como ocurren en otros estudios.<sup>215</sup> Dentro de un mismo campo de cancerización y dado que se trata de áreas próximas, los cambios moleculares presentes es esperable que en esta zona antes del tratamiento fueran muy análogos a los observados en la biopsia previa, con lo que la comparación realizada entre muestra pretratamiento y postratamiento consideramos válida. Dado que cada QA proviene de un agregado de células con una

mutación común dentro de un mismo y siendo próximas macroscópicamente, podrían presentar características microscópicas y/o genéticas distintas.

## CONCLUSIONES



---

## CONCLUSIONES

---

1. La **edad media** de las pacientes con QA de nuestra población ha sido de **79 años** (DT 7,6 años).
2. Con la TFD y mediante **microscopía óptica** se ha comprobado que:
  - a. **Disminuye** el grosor de la epidermis a la mitad.
  - b. **Aumenta** el grosor de la dermis en un 10%, coincidente con la aparición de una banda dérmica.
  - c. **Disminuye** el infiltrado inflamatorio, sus valores se invierten de medio, alto representando un 65% a valores ausente y bajo en un 90%.
3. Con la TFD y mediante técnicas **inmunohistoquímicas** se ha observado que:
  - a. **Reduce** la expresión del p53, marcador precoz de oncogénesis en la epidermis.
  - b. **No se modifica** la proliferación celular de la epidermis, reflejada por la expresión del Ki-67 en todos los casos analizados.
  - c. **Aumenta** el grosor de las fibras de colágeno tipo IV.
4. La hipótesis se eleva a la categoría de tesis quedando demostrado que producen modificaciones beneficiosas que corrigen la estructura histológica cutánea, considerando que es muy útil el tratamiento.



# **DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

## **HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE**

**TITULO DEL PROYECTO:** ESTUDIO CLÍNICO PATOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN PACIENTES CON QUERATOSIS ACTÍNICAS DE CUERO CABELLUDO.

---

### **Introducción**

Nos gustaría que considerara su participación en este estudio. Por favor, lea atentamente la siguiente información y tómese el tiempo necesario para decidir si desea o no participar.

*Gracias de antemano por la lectura de este documento*

---

### **¿Cuál es el objetivo del estudio?**

Este estudio tiene como finalidad principal la obtención de una amplia información acerca de los resultados clínicos y microscópicos de la terapia fotodinámica en el tratamiento de las queratosis actínicas como la que usted padece y, en concreto estudiar que es un tratamiento eficaz, seguro, bien tolerado y con un excelente resultado cosmético. Su principal ventaja es la capacidad de tratar múltiples lesiones a la vez (las otras alternativas son la crioterapia o terapia por frío, el imiquimod un medicamento de aplicación local y la cirugía, que solo trata una lesión). Nuestra intención es comparar los resultados obtenidos con los de otras series publicadas, las cuales han demostrado ya la efectividad de este tratamiento en pacientes con las mismas características clínicas que usted.

Si decide participar en el estudio deberá tomarse una muestra de piel (biopsia) antes del tratamiento, 2 sesiones de tratamiento con un intervalo de 3 meses, y una nueva toma de muestra de piel tras finalizar el tratamiento. La primera de estas muestras de piel forma parte del tratamiento habitual que recibiría si no participara. Su médico no cambiará la atención ni el tratamiento y no deberá someterse a visitas o pruebas adicionales por participar en el estudio, diferente a la descrita.

Puede que no exista una ventaja inmediata para usted pero esperamos que la información obtenida sirva para mejorar la atención y el tratamiento de pacientes como usted en el futuro.

---

### **¿Estoy obligado a participar?**

Puede usted decidir si desea o no participar. Si accede a tomar parte en el estudio, se le entregará una copia de este documento informativo para que lo guarde y se le pedirá que firme un consentimiento. Esta decisión no afectará a los cuidados que reciba ni a su tratamiento.

---

## ¿Qué ocurrirá si decido participar?

Si decide participar, su médico recogerá una serie de datos generales, a partir de los datos de su historial clínico, siendo citado dos miércoles con un intervalo de 3 meses, de 9:00 a 12:00hs (tiempo donde tendrá aplicada una crema en el cuero cabelludo cubierto por una capelina para someterse después a 7 minutos de luz roja), posteriormente contestará un cuestionario encaminado a objetivar su calidad de vida tras haber sido sometido al tratamiento con fototerapia. A continuación se describe el procedimiento:

1. Aplicación de la crema metil amino levulinato (MAL): aplicar la crema y cubrir el área con un vendaje oclusivo y opaco.
2. Tiempo de espera para la absorción: 3 horas.
3. Iluminación: luz roja con longitud de onda 635 nm.
4. Cuidados post-tratamiento: Crema con factor de protección 50 de la zona tratada durante 2 días.

La biopsia de piel no está exenta de complicaciones, alguna de ellas de cierta importancia (infección de la piel entre otras), además del discomfort que para usted supondría la realización de la misma, aunque se practique bajo anestesia local. La biopsia de cuero cabelludo de queratosis actínicas, en la práctica clínica habitual, solo la realizamos antes del tratamiento, pero no después. Esta segunda biopsia se realizará únicamente si usted voluntariamente decide someterse a ella.

---

## Confidencialidad

Si decide participar en este estudio, su identidad permanecerá en el anonimato. Todos sus datos serán confidenciales, pudiendo ser inspeccionados por personal cualificado para analizar los resultados.

---

## El derecho a la protección de sus datos personales

El estudio requiere la recogida de datos personales. Algunos de estos datos son de carácter general (como, por ejemplo, edad,...) y otros están relacionados con la salud (por ej., su historia clínica y estado físico, referidos como datos personales delicados). Mediante la firma del consentimiento informado Ud. autoriza dicha recogida y tratamiento de datos. El tratamiento de dichos datos se llevará a cabo de acuerdo con la legislación aplicable en materia de privacidad. Se cumplirá en todo momento con lo establecido por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Se adoptarán las medidas oportunas para garantizar la debida protección de los datos en todo momento, sin violación alguna de la confidencialidad. Usted tiene derecho a pedir que le sean desvelados aquellos datos personales mantenidos de forma identificable, así como a solicitar la rectificación de cualquier dato incorrecto o incompleto. Ni usted ni ninguna otra persona que pueda ver los resultados del estudio podrá identificar a las personas que han participado en el mismo.

*Gracias por su atención. Si accede a participar en este estudio, su médico le entregará una copia de esta hoja de información para el paciente y una copia firmada del formulario de consentimiento.*

## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA EL PACIENTE

**TITULO DEL PROYECTO:** ESTUDIO CLÍNICO PATOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN PACIENTES CON QUERATOSIS ACTÍNICAS DE CUERO CABELLUDO.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

*Por favor, marque las casillas correspondientes*

1. Confirmo que he leído y comprendido la hoja informativa del estudio referido y se me ha entregado una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento y la hoja de información para el paciente. ☐
2. Se me ha concedido tiempo y la oportunidad de formular preguntas sobre el estudio y todas ellas han quedado contestadas. ☐
3. Comprendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de retirar el consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de ofrecer ninguna razón y sin que ello afecte a mis derechos legales ni a mi tratamiento médico en el futuro. ☐
4. Soy consciente de que, al participar en el estudio, se recogerán y procesarán datos personales confidenciales. Se me ha informado con detalle de los motivos por los que se recogen y procesan estos datos y de quién tendrá acceso a estos datos y se me ha explicado que tengo derecho a acceder a esta información y a rectificarla. ☐
5. Comprendo que mis ficheros médicos podrán ser revisados por las personas designadas para analizar los datos, ☐
6. Accedo a participar en el estudio mencionado y autorizo la recogida, procesamiento y transferencia de mis datos personales. ☐

\_\_\_\_\_  
Nombre y apellido del paciente F echa F irma

**Confirmo que he explicado la naturaleza, los objetivos y los efectos previsibles del estudio a la persona cuyo nombre figura arriba. La persona expresó su consentimiento firmando y fechando este documento.**

\_\_\_\_\_  
Médico F echa F irma

*Copia para el sujeto*

S. Dermatología Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla

**UNIDAD DE  
TERAPIA  
FOTODINÁMICA**

CODIGO DE IDENTIFICACION

FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS para ESTUDIO CLINICO-PATOLOGICO  
DE LOS EFECTOS DE LA TERAPIA FOTODINAMICA EN PACIENTES CON  
QUERATOSIS ACTINICAS  
DE CUERO CABELLUDO

|   | PRIMERA SESIÓN | SEGUNDA SESION<br>(3 MESES) |
|---|----------------|-----------------------------|
| Procedencia (ISFAS / SERMAS/ Otro)  |                |                             |
| Edad  |                |                             |
| Fototipo I II III IV V VI   |                |                             |
| Calvicie I II III IV V VI VII   |                |                             |
| Fecha   |                |                             |
| Intensidad Queratosis actínicas<br>(+ = ligera ++ = moderada<br>+++ = intensa)  |                |                             |
| Fotoenvejecimiento (0, 1, 2, 3, 4)  |                |                             |
| Dosis (J/cm2)   |                |                             |
| Nivel (mW/cm2)  |                |                             |
| Cantidad de Metvix  |                |                             |
| Dolor (0=ninguno 1=leve 2=moderado<br>3=intenso)  |                |                             |
| Anestesia durante sesion (Si / No)  |                |                             |
| Efectos secundarios (Eritema, Costras,<br>ampollas)   |                |                             |
| Efectos adversos (crema)  |                |                             |
| Resultados medicos: + ++ +++  |                |                             |
| Resultados cosméticos: + ++ +++   |                |                             |
| Grado satisfacción (1 a 10)   |                |                             |
| Antecedentes dermatológicos (CBC,<br>CEC, MM)   |                |                             |
| Encuesta (Si / No)  |                |                             |
| Factores de riesgo (Quemaduras,<br>Fotoprotector, UVA)  |                |                             |
| OTROS.<br>(Tratamientos médicos, enfermedades<br>concomitantes, trastornos endocrino –<br>metabólicos, situaciones personales...) |                |                             |
| Tratamientos anteriores:<br>Crioterapia, Aldara   |                |                             |
| Consultas/años:   |                |                             |
| Teléfono  |                |                             |
| Atendido por Dr:  |                |                             |
| Enfermero/a:  |                |                             |

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>1</sup> Harvey I, Frankel S, Marks R, et al. Non melanoma skin cancer and solar keratosis. I. Methods and descriptive results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer* 1996;74:1302-1307.
- <sup>2</sup> Glogau R. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:23-24.
- <sup>3</sup> Gloster HM, Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg* 1996; 22:217-226.
- <sup>4</sup> Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:S4-S7.
- <sup>5</sup> McIntyre WJ, Downs MR, Bedwell SA. Treatment options for actinic keratoses. *Am Fam Physician* 2007 Sep 1;76(5):667-671.
- <sup>6</sup> Kaufmann R, Spelman L, Weightman W, Reifemberger J, Szeimies RM, Verhaeghe E, Kerrouche N, Sorba V, Villemagne H, Rhodes LE. Multicentre intraindividual randomized trial of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy vs. cryotherapy for multiple actinic keratoses on the extremities. *Br J Dermatol* 2008 May;158(5):994-999. Epub 2008 Mar 13.
- <sup>7</sup> Barrera MV, Herrera E. Topical chemotherapy for actinic keratosis and nonmelanoma skin cancer: current options and future perspectives. *Actas Dermosifiliogr* 2007 Oct;98(8):556-562.
- <sup>8</sup> Gold MH. Pharmacoeconomic analysis of the treatment of multiple actinic keratoses. *J Drugs Dermatol* 2008 Jan;7(1):23-25.
- <sup>9</sup> Ericson MB, Wennberg AM, Larkö O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Ther Clin Risk Manag* 2008 Feb;4(1):1-9.
- <sup>10</sup> Ruiz-Rodríguez R, López L, Candelas D, Pedraz J. Photorejuvenation using topical 5-methyl aminolevulinate and red light. *J Drugs Dermatol* 2008 Jul;7(7):633-637.
- <sup>11</sup> Wolfe CM, Hatfield K, Cognetta AB Jr. Cellulitis as a postprocedural complication of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis. *J Drugs Dermatol* 2007 May;6(5):544-548.
- <sup>12</sup> Nakano A, Tamada Y, Watanabe D, Ishida N, Yamashita N, Kuhara T, Yanagishita T, Kawamura C, Akita Y, Matsumoto Y. A pilot study to assess the efficacy of photodynamic therapy for Japanese patients with actinic keratosis in relation to lesion size and histological severity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009 Feb;25(1):37-40.



- 
- <sup>13</sup> Pariser D, Loss R, Jarratt M, Abramovits W, Spencer J, Geronemus R, Bailin P, Bruce S. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for treatment of multiple actinic keratoses: A randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol* 2008 Oct;59(4):569-576. Epub 2008 Aug 15.
  - <sup>14</sup> Tierney EP, Eide MJ, Jacobsen G, Ozog D. Photodynamic therapy for actinic keratoses: survey of patient perceptions of a treatment satisfaction and outcomes. *J Cosmet Laser Ther* 2008 Jun;10(2):81-86.
  - <sup>15</sup> Stritt A, Merk HF, Braathen LR, von Felbert V. Photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis. *Photochem Photobiol* 2008 Mar-Apr;84(2):388-98. Epub 2008 Jan 23.
  - <sup>16</sup> Lehmann P. Methyl aminolevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2007 May;156(5):793-801. Epub 2007 Apr 5.
  - <sup>17</sup> Annemans L, Caekelbergh K, Roelandts R, Boonen H, Leys C, Nikkels AF, van Den Haute V, van Quickenborne L, Verhaeghe E, Leroy B. Real-life practice study of the clinical outcome and cost-effectiveness of photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in the management of actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*. 2008 Sep-Oct;18(5):539-46. Epub 2008 Aug 8.
  - <sup>18</sup> Slaughter DP, Southwick HW, Mejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6: 963-968.
  - <sup>19</sup> Vatve M, Ortonne JP, Birch-MacHin MA, Gupta G. Management of field change in actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:21-24.
  - <sup>20</sup> Levine AJ, Momand J, Finlay A. The p53 suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
  - <sup>21</sup> Marchal-Escalona C, Diegues-Lucena JL, Garcia-Villanova J, et al. Gen de la proteína p53. Revisión de la literatura y valoración de las implicaciones pronósticas de sus mutaciones en el tumor vesical. *Actas Urol Esp* 1996;20:93-102.
  - <sup>22</sup> Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979;278:261-263.
  - <sup>23</sup> Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 1993;62:623-651.
  - <sup>24</sup> Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcripción activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990;249:1046-1048.
  - <sup>25</sup> Hupptr, Meek DW, Midgley CA, et al. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 1992;71:875-886.

- 
- <sup>26</sup> Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, et al. Oncoprotein mdm2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 1993;362:857-860.
- <sup>27</sup> Ullrich SJ, Anderson CW, Mercer WE, et al. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem* 1992;267:15259-15262.
- <sup>28</sup> Bischoff JR, Friedman PN, Marshak DR, et al. Human p53 is phosphorylated by P64-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4766-4770.
- <sup>29</sup> Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumor antigen p53 in nontransformed cells. *Nature* 1984;308:199-201.
- <sup>30</sup> Wagner P, Simanis V, Maimets T, et al. A human tumour derived mutant p53 protein induces a p34 reversible growth arrest in fission yeast. *Oncogene* 1991;6:1633-1639.
- <sup>31</sup> Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-1327.
- <sup>32</sup> Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
- <sup>33</sup> Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell* 1992;71:587-597.
- <sup>34</sup> Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992;71:543-546.
- <sup>35</sup> Berns A. Is p53 the only real tumor suppressor gene? *Current Biol* 1994;4(2).
- <sup>36</sup> Cotran R, Kumar J, Robbins S. Neoplasia. En: Schoen F. ed. Robbins. Patología estructural y funcional 5a ed esp Madrid: Mc Graw Hill Interamericana de España, 1995:302.
- <sup>37</sup> Levine AJ, Perry A, Chang A, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69:409-416.
- <sup>38</sup> Shaulsky G, Zeev AB, Rotter V. Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c3T3 cells. *Oncogene* 1990;5:1707-1711.
- <sup>39</sup> Zlotta AR, Noel JC, Fayt I, et al. Correlation and prognostic significance of p53, p21 and ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol* 1999;161:792-798.
- <sup>40</sup> Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, et al. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Som Cell Mol Gen* 1985;11:505-509.
- <sup>41</sup> Miller C, Mohandas T, Wolf T, et al. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986;319:783-784.

- 
- 42 Perry A, Chang A, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69:409-416.
- 43 Kern SE, Kinzler KW, BAKER SJ. et al. Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene* 1991;6:131-136.
- 44 Wolff JM, Habib FK. Tumor suppressor genes in urologic tumors. *Urology* 1993;42:461-467.
- 45 Kern SE, Kinzler KW, Baker SJ. et al. Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene* 1991;6:131-136.
- 46 Yandel DW, Thor AD. p53 analysis in diagnostic pathology: biologic implications and possible clinical applications *Diag Mol Pathol* 1993;2:1-3.
- 47 Halery O, Michalovitz D, Oren M. Different tumor derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science* 1990;250:113-116.
- 48 Dittmer D, Pati S, Zambetti, et al. p53 gain of function mutations. *Nature Gen* 1993;4:42-46.
- 49 Eliyanu D, Raz A, Gruss P, et al. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984;312:646-649.
- 50 Parada LF, Land LH, Weinberg RA, et al. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984;312:649-651.
- 51 Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083-1093.
- 52 Gao J, Huang HY, Park I, et al. p53 deficiency provokes urothelial proliferation and synergizes with activated ras in promoting urothelial tumorigenesis. *Oncogene* 2004;23:687-696.
- 53 Lillienfeld AM, Levin ML, Moore GE. The association of smoking with cancer of the urinary bladder in humans *Arch Intern Med* 1956;98:129-135.
- 54 Harris AL. Mutant p53 the commonest genetic abnormality in human cancer. *J Pathol* 1990;162:5-6.
- 55 Roger A, Popliker M, Webb GO, et al. P53 cellular tumor antigen analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos and tumors. *Mol Cell Biol* 1985;5:2851-2856.
- 56 Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-1327.
- 57 Hollstein M, Sindrasky D, Vogelstein B, et al. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.

- 
- <sup>58</sup> Bartek J, Bartkova J, Vojtesk B, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6:1699-1703.
- <sup>59</sup> Bosaris S, Lee AK, Viale G, et al. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node negative breast carcinomas with long term follow-up. *Virchows Arch* 1992; 421:291 -295.
- <sup>60</sup> Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;335:675-679.
- <sup>61</sup> Soin Y, Kamel D, Nuorva K, et al. Low p53 protein expression in salivary gland tumours compared with carcinomas. *Virchows Arch* 1992;421:415-420.
- <sup>62</sup> Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70 p53 complex with an altered half life. *Mol Cell Biol* 1988;8:531-539.
- <sup>63</sup> Cordon-Cardo C, Dai-Bagni G, Saez GT, et al. P53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56:347-353.
- <sup>64</sup> Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, et al. P53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993;143:1389-1397.
- <sup>65</sup> Gardiner RA, Walsh M, Rahman A, et al. Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *Brit J Urol* 1994;73:526-532.
- <sup>66</sup> Banks L, Matlashewski G, Grawford L. Isolation of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem* 1986;159:529-534.
- <sup>67</sup> Marx L, Dietel J, Horny HP. Overexpression or mutation of the p53 tumor suppressor gene does not occur in malignant ovarian germ cell tumors. *Cancer* 1996;78:179-180.
- <sup>68</sup> Gannon JV, Graves R, Iggo R, et al. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990;9:1595-1602.
- <sup>69</sup> Midgley CA, Fisher CJ, Bartek J, et al. Expression of human p53 in bacteria: applications to the analysis of p53 expression in human tumors. *J Cell Sci* 1992; 101:183-189.
- <sup>70</sup> Ball RK, Siegel B, Quellhorsts S, et al. Monoclonal antibodies against human virus 40 nuclear large-T tumor antigen: epitope mapping, papova virus cross-reaction and cell surface staining. *EMBO J* 1984;3:1485-1491.

- 
- 71 Barnes DM, Hanby AM, Gillett CE, et al. Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet* 1992;340:259-263.
- 72 Cesarman E, Inghirami G, Chadburn A, et al. High levels of 53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 1993;143:845-855.
- 73 Deitos AP, Doglioni C, Laurino M, et al. P53 protein expression in non-neoplastic lesions and benign and malignant neoplasms of the soft tissue. *Histopathology* 1993;22:45-50.
- 74 Oliner JD, Kinzler KW, Melzer PS, et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80-83.
- 75 Triviño A, Lopez A. La oncoproteína p53. *Med Clin* 1994;103:56-58.
- 76 Ahakangas KH, Samet JM, Metcalf RM. et al. Mutations of p53 and ras in random associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 1992;339:576-580.
- 77 Sauter G, Deng G, Moch H, et al. Physical deletion of the P53 gene in bladder cancer: Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994;144:756-766.
- 78 Davidoff AM, Kerns BM, Iglehart JD, et al. Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991;51:2605-2610.
- 79 Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez ZM, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994;54:784-788.
- 80 Ross RK, Paganini-Hill A, Henderson BE. Epidemiology of bladder cancer. In Skinner D, Lieskovsky G cds. *Diagnosis and management of genitourinary cancer*. Philadelphia: Saunders 1988:23-31.
- 81 Spruck CH, Rideout WM, Olumiaf F, et al. A distinct pattern of mutations in bladder cancer: Relationship to tobacco usage. *Cancer Res* 1993;53:1162-1166.
- 82 Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, et al. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:5736-5743.
- 83 Cairns P, Mao L, Merlo A, et al. Rates of p16 (MTS1) mutation in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994;265:415-416.
- 84 Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, et al. Allelic losses of chromosome 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res* 1990;50:44-47.
- 85 Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5'CpG island of pl6/CDKN2 tumor suppressor gen in normal and transformed tissue correlated with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-4535.

- 
- <sup>86</sup> Sidransky D, Von Eschenb A, Tsaii C, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and unne samples. *Science* 1991;25:705-709.
- <sup>87</sup> Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994;331:1259-1264.
- <sup>88</sup> Lipponen PK. Over expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer its prognostic value. *Int J Cancer* 1993;53:365-370.
- <sup>89</sup> Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Nuclear over expression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: A marker for disease progression. *J Nat Cancer Int* 1993;85:53-59.
- <sup>90</sup> Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez ZM, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994;54:784-788.
- <sup>91</sup> Vetja M, Witjes JA, Marras SA, et al. Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1055-1061.
- <sup>92</sup> Cina SJ, Lancaster-Weiss KJ, Lecksell K, et al. Correlation of Ki-67 and p53 with the New World Health Organization / International Society of Urological Patology Classification System for Urothelial Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125:646-651.
- <sup>93</sup> Wagner U, Sauter G, Moch H, et al. Patterns of p53, erbB-2, and EGF-r expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1995;26(9):970-978.
- <sup>94</sup> Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, et al. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:5736-5743.
- <sup>95</sup> Van der Pols JC, Xu C, Boyle GM, Parsons PG, Whiteman DC, Green AC. Expression of p53 tumor suppressor protein in sun-exposed skin and associations with sunscreen use and time spent outdoors: a community-based study *Am J Epidemiol* 2006;163:982-988.
- <sup>96</sup> Stratlgos AJ, Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou A, Pagouni A, Christofldou E, Petridis A, Papadopoulos O, Kokka E, Antoniou C, Georgala S, Katsambas AD. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19:180-186.
- <sup>97</sup> Benjamin CL, Ananthaswamy HN. P53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224:241-248.
- <sup>98</sup> Boukamp P. UV-induced skin cancer: similarities-variations. *J Dtsch Dermatol Ges* 2005;3:493-503.

- 
- 99 Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 2003; 21:217-228.
- 100 De Gruijl FR. P53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA and UVB effects. *Exp Dermatol* 2002; 11 Suppl 1:37-39.
- 101 Ananthaswamy HN, Loughlin SM, Cox P, Evans RL, Ullrich SE, Kripke ML. Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat Med* 1997;3:510-514.
- 102 Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma-a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol* 2009; 161 Suppl 3:107-115.
- 103 Melnikova VO, Pacifico A, Chimenti S, Peris K, Ananthaswamy HN. Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: relationship to skin cancer development. *Oncogene* 2005;24:7055-7063.
- 104 Brash DE. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *Br J Dermatol* 2006;154 Suppl 1:8-10.
- 105 Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, Li KT, Arain S, Barr RJ, Hite P, Sun JD, Meyskens FL. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1996-2002.
- 106 Gerdes J, Schwab U, Lemke H. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactiva with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
- 107 Gaffney CC, Sloane JP, Bradley NJ, et al. Primitive neuroectodermal tumours of the cerebrum. Pathology and treatment. *J Neurooncol* 1985;3:23-33.
- 108 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.
- 109 Mc Cormick D, Yu C, Hobbs C, et al. The prevalence of antibody concentration to the irnmunohistological quantification of cell proliferation-associated antigen. *Histopathology*. 1993;22:543-547.
- 110 Triviño-Lopez A, Carbajo-Perez E, Lopez-Muñiz A, et al. El antígeno de proliferación celular. Respuestas complejas a un apelativo simple. *Patología* 1994; 27:343-347.
- 111 Fallini B, Flenchi L, Faglioli M. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1989;37:1471-78.



- 
- <sup>112</sup> Verhiejen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation related antigen. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sc* 1989;92:123-130.
- <sup>113</sup> Mc Cormick D, Chong H, Hobbs C, et al. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and waxembedded section with the monoclonal antibody MIB-1 *Histopathology* 1993; 22:355-360.
- <sup>114</sup> Van Bockstaele DR, Lan J, Snoeck HW, et al. Aberrant Ki-67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry* 1991;12:50-63.
- <sup>115</sup> Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-873.
- <sup>116</sup> Braun N, Papadopoulos T, Muller HK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Wirschows Archiv B Cell Pathol* 1988;56:25-33.
- <sup>117</sup> Van Deirendock JH, Keijzer R, Cornelis JH. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle comparison with the growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1989;49:2999-3006.
- <sup>118</sup> Schonk DM, Kupers HJ, Van Drunen E. et al. Assignment of the gene(s) involved in the expresion of the proliferation related Ki-67 antegen to human cromosome 10. *Human Genet* 1989;83:297-299.
- <sup>119</sup> Cooper S. The continuum model: application to G1 arrest and G0. In Nicolini C ed. *Cell Growth: NATO Advanced study series. A life sciences*. New York: Plenum Press, 1982;38:315-336.
- <sup>120</sup> Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation associated antibody Ki-67 and propidium iodide analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 1987;387-391.
- <sup>121</sup> Landberg G, Tan EM, Roos G. Citometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res* 1980;187:111-118.
- <sup>122</sup> Sasaki K, Matsunara K, Tsuji T, et al. Relationship between labelins indice of Ki-67 and BrdU in human malignant tumors. *Cancer* 1988;62:989-993.
- <sup>123</sup> Verhiejen R, Kuijpers HJ, Van Driel R, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation related antigen. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sc* 1989;92:531-540.



- 
- <sup>124</sup> Guillaud P, Du Manoir S, Seigneurin D. Cuantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumor cell lines (MCF-7) *Analyt Cell Pathol* 1989;1:25-39.
- <sup>125</sup> Scott CS, Fey SL, Larsen PM. Cytoplasmic Ki-67 expresion: a reply to Dario Campana, Elaine Coustan-Smith and George Janossy. *Leukemia* 1989;3:397.
- <sup>126</sup> Campan D, Coustan-Smith E, Janossy G. «Cytoplasmic» expression of nuclear antigens. *Leukemia* 1989;3:239-241.
- <sup>127</sup> Bruno S, Darzynkiewicz A. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992;25:31-40.
- <sup>128</sup> Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 1987;387-391.
- <sup>129</sup> Hitchcock CL. Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 1991;94:444-445.
- <sup>130</sup> Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, et al. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987;579-584.
- <sup>131</sup> Verhiejen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation related antigen intracellular localization during interphase. *J Cell Science* 1989;92:123-130.
- <sup>132</sup> Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503.
- <sup>133</sup> Wersto RP, Herz F, Gallagher RE, et al. Cell cycle dependant reactivity with the monoclonal antibody Ki-67 during myeloid cell differentiation. *Exp Cell Res* 1988; 179:79-88.
- <sup>134</sup> Sasaki K, Matsunara K, Tsuji T, et al. Relationship between labelins indice of Ki-67 and BrdU in human malignant tumors. *Cancer* 1988;62:989-993.
- <sup>135</sup> Du Manoir S, Guillaud P, Camus E, et al. Ki-67 labeling in post-mitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* 1991;12:445-463.
- <sup>136</sup> Bading H, Rauterberg E, Moelling K. Distribution of c-myc, c-myb, and Ki-67 antigens in interphase and mitotic human cells evidenced by immunofluorescence staining technique. *Exp Cell Res* 1989;185:50-59.
- <sup>137</sup> Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detected proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-363.

- 
- <sup>138</sup> Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, et al. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB-1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 1994;87:47-54.
- <sup>139</sup> Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin embedded tissues an enhancement method for immuno-histochemical staining based on microwave oven heating of tissue section. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-748.
- <sup>140</sup> Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988;107:1623-1628.
- <sup>141</sup> Jaskulski D, Gatti G, Travali S, et al. Regulation of the proliferation cell nuclear antigen cyclin and thymidins kinase mRNA levels by grow factors. *J Biol Chem* 1988;263:1075-1079.
- <sup>142</sup> Lynch DA, Clarke AM, Jackson P, et al. Comparison of labelling by bromodeoxyuridine, MIB-1, and proliferating cell nuclear antigen in gastric mucosal biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1994;47:122-125.
- <sup>143</sup> Onda K, Davis RL, Shibuya M, et al. Correlation between the bromodeoxyuridine labeling index and the MIB-1 and Ki-67 proliferating cell indices in cerebral gliomas. *Cancer* 1994;74(7):1921-1926.
- <sup>144</sup> Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986;234:364-367.
- <sup>145</sup> Gaffney CC, Sloane JP, Bradley NJ, et al. Primitive neuroectodermal tumours of the cerebrum. Pathology and treatment. *J Neurooncol* 1985;3:23-33.
- <sup>146</sup> Scott JU, Hall PA, Haldane JS, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991;165:173-178.
- <sup>147</sup> Tubiana M, Courdi A. Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long-term survival. *Radiotherapy Oncol* 1989;15:1-18.
- <sup>148</sup> Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, et al. Ki-67 immunostaining in breast primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 1990;59:943-956.
- <sup>149</sup> Carbin BE, Ekman P, Gustafson H, et al. Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency. II Prognostic importance. *J Urol* 1991;145:972-976.
- <sup>150</sup> Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 1977;40:818-831.

- 
- <sup>151</sup> Gerdes J, Stein H, Pireli S, et al. Prognostic relevance of tumor cell growth fraction in malignant non Hodgkin's Lymphomas. *Lancet* 1987;2:448-449.
- <sup>152</sup> Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in difusse large cell lymphomas as determined by monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1988;71:1157-1160.
- <sup>153</sup> Ellison DW, Steart PV, Bateman AC, et al. Prognostic factors in a range of astrocytic tumours: an immunohistochemical study with Ki-67 and p53 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59:413-419.
- <sup>154</sup> Kirkegaard JL, De Rose PB, Yao B, et al. Image cytometric measurement of nuclear proliferation markers (MIB1, PCNA) in Astrocytomas. Prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1998;109:69-74.
- <sup>155</sup> Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, et al. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 1994;34(4):674-679.
- <sup>156</sup> Pollack IF, Campbell JW, Hamilton RL, et al. Proliferation index as a predictor of prognosis in malignant gliomas of chidhood. *Cancer* 1997;79:849-856.
- <sup>157</sup> Sallinen PK, Haapasalo HK, Visakorpi T, et al. Prognostication of astrocytoma patient survival by Ki-67(MIB1), PCNA, and S-phase fraction using archival paraffin-embedded samples. *J Pathol* 1994;174:275-282.
- <sup>158</sup> Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 1996;77(2):373-380.
- <sup>159</sup> Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 1986;10:611-617.
- <sup>160</sup> Deckert M, Reifenberger G, Wechsler W. Determination of the proliferative potential of human brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989;115:179-188.
- <sup>161</sup> Patsouris E, Stocker U, Kallmeyer V, et al. Relationship between Ki-67 positive cells, growth rate, and histologic type of human intracranial tumors. *Anticancer Res* 1988;8:537-544.
- <sup>162</sup> Pigott TJ, Lowe JS, Palmer J. Statistical modelling in analysis of prognosis in glioblastoma multiforme: a study of clinical variables and Ki-67 index. *Br J Neurosurg* 1991;5:61-66.

- 
- <sup>163</sup> Tsanaclis AM, Robert F, Michaud J, et al. The cycling pool of cells within brain tumors: In situ cytokinetics using the monoclonal antibody Ki-67. *Can J Neurol Sci* 1991;18:12-17.
- <sup>164</sup> Kiss R, De Witte O, Decaestecker C, et al. The combined determination of proliferative activity and cell density in the prognosis of adult patients with supratentorial high-grade astrocytic tumors. *Am J Clin Pathol* 1997;107:321-331.
- <sup>165</sup> Zuber P, Hamou MF, Tribolet N. Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery* 1988;22:364-368.
- <sup>166</sup> Wesseling P, Laak J, Link M, et al. Quantitative analysis of microvascular changes in diffuse astrocytic neoplasms with increasing grade of malignancy. *Human Pathol* 1998;29(4):352-358.
- <sup>167</sup> Coons SW, Johnson PC. Regional heterogeneity in the proliferative activity of human gliomas as measured by Ki-67 labeling index. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:609-618.
- <sup>168</sup> Dalrymple SJ, Parisi JE, Roche PC, et al. Changes in proliferating cell nuclear antigen expression in glioblastoma multiforme cells along stereotactic biopsy trajectory. *Neurosurgery* 1994;35:1036-1045.
- <sup>169</sup> Schroder R, Bien K, Kott R, et al. The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol* 1991;82:389-394.
- <sup>170</sup> Vatve M., Ortonne J.P., Birch-Marchin , Gupta G. Management of field change in actinic keratosis. *Br J Dermatol.* 2007;157:21-4.
- <sup>171</sup> Orringer JS, Hammerberg C, Hamilton T, Johnson TM, Kang S, Sachs DL, Fisher G, Voorhees JJ. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. *Arch Dermatol.* 2008 Oct;144(10):1296-1302.
- <sup>172</sup> Ackerman AB. *Histologic Diagnosis Of Inflammatory Skin Diseases: An Algorithmic Method Based On Pattern Analysis*, 1ª ed. Editorial Lea; 1990.p125-136.
- <sup>173</sup> Bologna JL. *Dermatología*, 2ª ed. Editorial Elsevier España; 2004.p1395-1397.
- <sup>174</sup> Wolff K. Fitzpatrick. *Dermatology in general Medicine*, 7ª ed. Editorial Mc.Graw-hill Interamericana; 2009.p89-94.
- <sup>175</sup> Touma D, Yaar M, Whitehead S, Konnikov N, Gilchrest BA. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratoses and diffuse photodamage. *Arch Dermatol* 2004;140:33-40.

- 
- 176 Orringer JS, Hammerberg C, Hamilton T, Johnson TM, Kang S, Sachs DL, et al. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. *Arch Dermatol* 2008; 144:1296–1302.
- 177 Dover JS, Bhatia AC, Stewart B, Arndt KA. Topical 5-aminolevulinic acid combined with intense pulsed light in the treatment of photoaging. *Arch Dermatol* 2005;141: 1247–1252.
- 178 Lowe NJ, Lowe P. Pilot study to determine the efficacy of ALA-PDT photo-rejuvenation for the treatment of facial ageing. *J Cosmet Laser Ther* 2005;7:159–162.
- 179 Gold MH, Bradshaw VL, Boring MM, Bridges TM, Biron JA. Split-face comparison of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. *Dermatol Surg* 2006;32:795–803.
- 180 Marmur ES, Phelps R, Goldberg DJ. Ultrastructural changes seen after ALA-IPL photorejuvenation: a pilot study, *J Cosmet Laser Ther* 2005;7:21–24.
- 181 Conejo-Mir J, Moreno JC, Camacho FM. Manual de dermatología. Fotoprotección, 1ª ed. Grupo aula médica de España; 2010.p1369-1389.
- 182 Vilata Corell JJ. Manual de dermatología u venerología. Patrones de pérdida de pelo en los hombres, 1ª ed. Editorial médica panamericana;2008.p741.
- 183 Aceituno-Maderz P, Buendia-Eisman A, Arias-Santiago S, Serrano-Ortega S. Changes in the incidence of skin cancer between 1978 and 2002. *Actas Dermosifiliogr* 2010;101:39-46.
- 184 Arara A, Attwood J. Common skin cancers and their precursors. *Surg Clin North Am* 2009;89:703-712.
- 185 Selte S, Fourtanier AM. The benefit of daily photoprotection. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:S160-S166.
- 186 Moyal, D. D. and Fourtanier, A. M. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:S149-S154.
- 187 Huncharek M, Kupelnick B. Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case control studies. *Am J Public Health* 2002;92:1173-1177.
- 188 Valnio H, Miller AB, Bianchini F. An international evaluation of the cancer-preventive potential of sunscreens. *Int J Cancer* 2000;88:838-842.
- 189 Ulrich C, Jurgensen JS, Degen A, Hackethal M, Ulrich M, Patel MJ, Eberle J, Terhorst D, Sterry W, Stockfleth E. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ

- transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol* 2009;161 Suppl 3:78-84.
- <sup>190</sup> Fernández-Guarino M, García-Morales I, Harto A, Montull C, Pérez-García B, Jaen P. Terapia fotodinámica: nuevas indicaciones. *Actas Dermosifiliogr* 2007;98:377-95.
- <sup>191</sup> Szeimies RM, Barrer S, Radakovic-Fijan S, Tanew A, Calzavara-Pinton PG, Zane C, et al. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:258-62.
- <sup>192</sup> Morton C, Campbell S, Gupta G, Keohane S, Lear J, Zaki I, et al. Intraindividual right-left comparison of topical methyl-aminolevulinate-photodynamic therapy (MAL-PDT) and cryotherapy in subject with actinic keratosis: a multicentre, randomized controlled study. *Br J Dermatol* 2006;155:1029-1036.
- <sup>193</sup> Wulf HC, Pavel S, Stender IM. Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. Presented at the 13th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), Florence, Italy, November 18-24,2004.
- <sup>194</sup> Dragieva G, Prinz BM, Hafner J, Dummer R, Burg G, Binswanger U, Kempf WA. Randomized controlled clinical trial of topical photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in the treatment of actinic keratoses in transplant recipients. *Br J Dermatol* 2004;151:196-200.
- <sup>195</sup> Wennberg AM, Keohane S, Lear JT. A multicenter study with MAL-PDT cream in immuno-compromised organ transplant recipients with non-melanoma skin cancer. Poster presented at the European Academy of Dermatology and Venereology(EADV) meeting, London. 2005.
- <sup>196</sup> De Graaf YG, Kennedy C, Wolterbeek R, Collen AF, Willemze R, Bouwes Bavinck JN. Photodynamic therapy does not prevent cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients: results of a randomized controlled trial. *J Invest Dermatol* 2006;126:569-574.
- <sup>197</sup> Ughelli-Yampey GE, Vidal-Asensi S, Gonzáles MA, et al. Terapia fotodinámica en queratosis actínicas, nuestra experiencia clínica. *Actas Dermosifiliogr* (Número especial 2) 2010;101:78.
- <sup>198</sup> Vidal-Asensi S, Gonzáles MA, Ughelli-Yampey GE, et al. Parámetros de la evaluación coste-eficacia de la Terapia Fotodinámica a nivel Hospitalario. *Actas Dermosifiliogr* (Número especial 2) 2010;101:76.
- <sup>199</sup> Vidal-Asensi S, Gonzáles MA, et al. Terapia fotodinámica en queratosis actínicas: análisis descriptivo de 100 pacientes tratados y de los resultados clínicos obtenidos. *Actas Dermosifiliogr* (Número especial 2) 2010;101:71-72.

- 
- 200 Park MY, Sohn S, Lee E, Kim YC. Photorejuvenation induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with actinic keratosis: A histologic analysis. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:85-95.
- 201 Fisher GJ, Kang S, et al. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol* 2002;138:1462-1470.
- 202 Frost GA, Halliday GM, Damian DL. Photodynamic Therapy-Induced Immunosuppression in Humans Is Prevented by Reducing the Rate of Light Delivery. *J Invest Dermatol* 2011;Epub Jan 20.
- 203 Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, Yamauchi PS. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:227-232.
- 204 Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF, Glazer SD, Goodman JJ, Hruza LL, Jeffes EW, Ling MR, Phillips TJ, Rallis TM, Scher RK, Taylor CR, Weinstein GD. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol* 2004;140:41-46.
- 205 Tarstedt M, Rosdahl I, Berne B, Svanberg K, Wennberg AM. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm Venereol* 2005;85:424-428.
- 206 Vieira MT, Olej B, Mandarim-de-Lacerda CA, Manela-Azulay M. Photorejuvenation with topical methyl aminolevulinate and red light: a randomized, prospective, clinical, histopathologic, and morphometric study. *Dermatol Surg* 2010;38:39-48.
- 207 Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, Li KT, Arain S, Barr RJ, Hite P, Sun JD, and Meyskens FL, Jr. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1996-2002.
- 208 Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou A, Pagouni A, Christofidou E, Petridis A, Papadopoulos O, Kokka E, Antoniou C, Georgala S and Katsambas, AD. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19:180-186.
- 209 Talghini S, Halimi M and Baybordi H. Expression of P27, Ki-67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci* 2009;12:929-933.



- 
- 210 Kim KH, Park EJ, Seo YJ, Cho HS, Kim CW, Kim KJ and Park HR. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol* 2006;33:319-325.
- 211 Fritsch C, Abels C, Goetz AE, Stahl W, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G and Sies H. Porphyrins preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid. *Biol Chem* 1997;378:51-57.
- 212 Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS and Knuechel R. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol* 2000;72:226-233.
- 213 Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, Andrade NE and Battle AM. Heme biosynthesis in human breast cancer-mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem* 1990;22:1407-1411.
- 214 Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, Li KT, Arain S, Barr RJ, Hite P, Sun JD, and Meyskens FL, Jr. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1996-2002.
- 215 Bagazgoitia L. La terapia fotodinámica y sus implicaciones en la prevención de queratosis actínicas y carcinoma epidermoide [Tesis doctoral]. Alcalá de Henares (Madrid): facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá de Henares; 2010.
- 216 Gallegos ER, DeLeon, Rodriguez I, Martinez Guzman LA, and Perez Zapata AJ. In vitro study of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix. *Arch Med Res* 1999; 30:163-170.
- 217 Riesenbergr R, Fuchs C and Kriegmair M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer* 1996;32A:328-334.
- 218 Smits T, Klelnpenning MM, Blokk WA, van de Kerkhof PC, van Erp PF and Gerritsen MJ. Fluorescence diagnosis in keratinocytic intraepidermal neoplasias. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(8):624-631.
- 219 Tarsted M, Rosdahl I, Berne B, Svanberg K, Wennberg AM. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix®) in actinic keratosis on the face and scalp. *Acta Derm Venereol* 2005;85:424-428.
- 220 Szeimies RM, Barrer S, Radakovic-Fijan S, Tanew A, Calzavara-Pinton PG, Zane C, et al. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with



cryotherapy for actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:258-262.

- <sup>221</sup> Morton C, Campbell S, Gupta G, Keohane S, Lear J, Zaki I, et al. Intraindividual right-left comparison of topical methyl-aminolevulinate-photodynamic therapy (MAL-PDT) and cryotherapy in subject with actinic keratosis: a multicentre, randomized controlled study. *Br J Dermatol* 2006;155:1029-1036.
- <sup>222</sup> Van den Akker JT, Holroyd JA, Vernon DI, Sterenborg HJ and Brown SB. Chronic UVB exposure enhances in vitro percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid in hairless mouse skin. *Lasers Surg Med* 2004;34:141-145.